

# ***Documentos***

---

ISSN 1516-4691

Junho, 2013

**91**

## **O Uso do Sulfato de Cobre em Ecossistemas Aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce**

## **Documentos 91**

# **O Uso do Sulfato de Cobre em Ecossistemas Aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce**

*Fernanda Garcia Sampaio*

*Cheila de Lima Boijink*

*Francisco Tadeu Rantin*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Meio Ambiente**

Rodovia SP 340 Km 127,5 - Tanquinho Velho

Caixa Postal 69

CEP 13820-000 Jaguariúna, SP

Fone: (19) 3311-2650

Fax: (19) 3311-2640

<http://www.cnpma.embrapa.br>

[sac@cnpma.embrapa.br](mailto:sac@cnpma.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Ladislau Araújo Skorupa*

Secretária-Executiva: *Vera Lúcia S. S. de Castro*

Secretário: *José de Arimatéia de Araújo Sousa*

Bibliotecário: *Victor Paulo Marques Simão*

Membro Nato: *Marcelo Augusto Boechat Morandi*

Membros: *Lauro Charlet Pereira, Fagoni Fayer Calegario, Aline de Holanda Nunes Maia, Nilce Chaves Gattaz, Marco Antonio Ferreira Gomes e Rita Carla Boeira*

Editoração eletrônica: *Alexandre Rita da Conceição*

Revisão de texto: *Nilce Chaves Gattaz*

Normalização Bibliográfica: *Victor Paulo Marques Simão*

**1ª edição eletrônica (2013)**

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Meio Ambiente**

---

Sampaio, Fernanda Garcia.

O uso do sulfato de cobre em ecossistemas aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce / Fernanda Garcia Sampaio, Cheila de Lima Boijunk, Francisco Tadeu Rantin. – Jaguariúna, SP : Embrapa Meio Ambiente, 2013.

101 p. — (Documentos / Embrapa Meio Ambiente; 91).

1. Ecossistema aquático 2. Poluição da água 3. Sulfato de cobre 4. Toxidez. I. Sampaio, Fernanda Garcia. II. Boijunk, Cheila de Lima. III. Rantin, Francisco Tadeu. IV. Título. V. Série.

CDD 577.627

# **Autores**

## **Fernanda Garcia Sampaio**

Zootecnista, Doutora em Ciências Fisiológicas, Embrapa  
Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal  
69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP.  
fernanda.sampaio@embrapa.br

## **Cheila de Lima Boijink**

Bióloga, Doutora em Ciências Fisiológicas, Embrapa  
Amazônia Ocidental, Rod. AM-010, Km 29, Zona Rural  
- CEP: 69010-970 Caixa Postal 319 - Manaus, AM.  
cheila.boijink@embrapa.br

## **Francisco Tadeu Rantin**

Biólogo, Doutor em Ecologia e Recursos Naturais, Rod.  
Washington Luís, km 235 - CEP 13565-905 - São  
Carlos, SP.  
ftrantin@ufscar.br

# Sumário

1. Introdução .....	06
1.1 O uso do sulfato do cobre em ecossistemas aquáticos e na aquicultura .....	08
1.2 Toxicidade do cobre .....	12
1.2.1. Conceitos de Toxicologia e Biomarcadores .....	12
1.2.2. Mecanismos de ação e fatores que influenciam a toxicidade do cobre .....	15
1.2.3. Influência do pH aquático na toxicidade do cobre .....	20
1.2.4. Influência do oxigênio dissolvido na toxicidade do cobre ...	24
1.3 O uso de biomarcadores na exposição ao cobre e aos fatores que influenciam sua toxicidade .....	31
1.3.1. Metabolismo oxidativo .....	31
1.3.2. Intermediários metabólicos .....	36
1.3.3. Metalotioninas .....	43
1.3.4. Enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase .....	46
1.3.5. Parâmetros Hematológicos .....	49
2. Considerações .....	55
Referências bibliográficas .....	57

# O Uso do Sulfato de Cobre em Ecossistemas Aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce

*Fernanda Garcia Sampaio*

*Cheila de Lima Bojink*

*Francisco Tadeu Rantin*

## 1. Introdução

O aumento mundial da contaminação de sistemas de água doce com inúmeros compostos químicos industriais e naturais é hoje um dos principais problemas ambientais (SCHWARZENBACH et al., 2006). Mineração, emissão de esgoto doméstico, aplicação de fertilizantes e pesticidas degradam severamente os ecossistemas aquáticos com metais pesados. Estas substâncias por não serem componentes naturais do organismo são chamadas xenobióticos (LIVINGSTONE, 1993; 1998; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). O ambiente aquático está, portanto, exposto a processos de poluição causados pela variedade e quantidade de substâncias químicas que nele ingressam. Via de regra, os estudos realizados para se conhecer o comportamento e os efeitos dos químicos nos organismos aquáticos são baseados na observação dos efeitos dos componentes isolados. Ferreira et al. (2008) acreditam que este modo de abordagem vem sendo modificado com o aumento das pesquisas de exposição a efeitos combinados.

As principais fontes de poluição nas águas interiores podem ser atribuídas a descargas de águas não tratadas, resíduos de efluentes industriais e resíduos da agricultura. A aquicultura, caracterizada nas últimas décadas como potencial atividade agropecuária (NEWMAN,

1993), não está isenta desta negativa contribuição, uma vez que utiliza, em sua cadeia produtiva, compostos que interferem diretamente na cadeia trófica dos sistemas aquícolas. Muitas vezes, estes compostos se revelam tóxicos também aos organismos em produção e, na verdade, a intensificação da aquicultura teve como consequência a elevada incidência e severidade de doenças (PAVANELLI et al., 1998). Além disso, as altas densidades de cultivo dos organismos aquáticos aumentam a concentração de matéria orgânica nos viveiros de produção, dificultando a manutenção da qualidade da água de cultivo (KUBTIZA, 1998). Dentre os principais produtos utilizados na piscicultura, para contornar as dificuldades no processo produtivo, podemos citar o sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) que, quando utilizado indevidamente, gera efeitos tóxicos para as espécies aquáticas (BEAUMONT et al., 2000; NOVELLI FILHO et al., 2000).

Os metais pesados, quando presentes em altas concentrações, estão entre as mais nocivas substâncias ativas capazes de causar sérios impactos nos sistemas metabólicos, fisiológicos, e até mesmo estruturais, nos organismos a eles expostos. Ao mesmo tempo, alguns metais agem como nutrientes essenciais em concentrações não-tóxicas (TORT, 1987). É o caso do cobre, que embora seja elemento essencial para o crescimento saudável dos organismos (PRASAD, 1984; COUSINS, 1985), mesmo em pequenas concentrações, pode ser perigoso para a biota aquática (NRIAGU, 1990).

O íon cobre, elemento traço essencial em biologia, se torna único quimicamente devido à sua propriedade de adotar status redox distinto, apresentando-se nas formas oxidada ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e reduzida ( $\text{Cu}^+$ ). Consequentemente, íons cobre servem como importantes co-fatores catalíticos na química redox de proteínas que possuem funções biológicas fundamentais exigidas no crescimento e desenvolvimento. Segundo Pena et al. (1999) estas proteínas são representadas, principalmente, pela Cu-Zn superóxido dismutase, enzima envolvida no processo de destoxificação de radicais livres, citocromo c oxidase, transportadora de elétrons na mitocôndria e pela metalotionina,

sequestradora de cobre. Proteínas que exigem cobre estão envolvidas em uma série de processos biológicos e alterações em suas atividades sempre causam distúrbios nos processos fisiológicos.

Os padrões de acumulação dos xenobióticos são diferentes para os distintos organismos e dependem do balanço entre a taxa de assimilação e a taxa de metabolização e eliminação destes compostos. Devido às diferenças nas formas de metabolizar os xenobióticos, é necessário detectar e avaliar o impacto de poluentes nos organismos expostos e não somente considerar a quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais. As respostas ao estresse são caracterizadas por mudanças fisiológicas e os efeitos dos poluentes nos peixes são obtidos por testes de toxicidade aguda e crônica (HEATH, 1991). Os processos fisiológicos normais são afetados bem antes da morte de um organismo, justificando o uso de indicadores fisiológicos e bioquímicos para compreendermos as alterações decorrentes da exposição sub-letal a tóxicos (VAN DER MERWE et al., 1992).

## **1.1 O uso do sulfato do cobre em ecossistemas aquáticos e na aquicultura**

Entre os numerosos compostos orgânicos que entram nos ecossistemas aquáticos o cobre é um dos mais difundidos poluentes e suas concentrações variam com sua forma química (ROY, 1997). O cobre é um componente natural do ambiente aquático e pode ser encontrado nas formas particulada, coloidal e dissolvido. Entre as fontes naturais de cobre encontram-se o intemperismo e as atividades vulcânicas. Como fontes antropogênicas destacam-se a mineração, atividades de fundição e a incineração. Além disso, o cobre é amplamente utilizado em formulações de fungicidas, bactericidas, algicidas e fertilizantes (BURATINI; BRANDELLI, 2006). Desta forma, os organismos aquáticos podem ser expostos ao cobre tanto de maneira intencional como acidental. As descargas industriais de compostos de cobre são geralmente adicionadas em águas onde os parâmetros variam consideravelmente. Características como a alcalinidade da água, dureza e pH influenciam fortemente a ação do cobre na água e, portanto, sua biodisponibilidade para os peixes (LAURÉN; MCDONALD, 1986;



MAZON; FERNANDEZ, 1999; TAO et al., 1999).

O sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) é um dos compostos mais utilizados como algicida e herbicida aplicado em reservatórios, lagos, e em viveiros de peixes (EFFLER et al., 1980; CARBONELL; TARANOZA, 1993). É amplamente utilizado para controlar a floração de algas e o crescimento de organismos aquáticos indesejados em viveiros de aquicultura (THORNTON; RAST, 1997). O  $\text{CuSO}_4$  é, também, regularmente utilizado como agente terapêutico em peixes (STRAUS, 1993) no controle efetivo de doenças bacterianas branquiais e uma variedade de parasitas, com destaque para infestações tais como a ictiofitiríase (*Ichthyophthirius multifiliis*, *Piscinoodinium pillulare*, REARDON; HARREL, 1990) e monogenea, *Anacanthorus penlabiatus*. Em países como o México, ou em continentes como América do Norte (THORBURN; MOCCIA, 1993), Ásia (TONGUTHAI, 1997) e África (HECHT; EDDEMANN, 1998), são feitas aplicações intermitentes de  $\text{CuSO}_4$  em peixes saudáveis como forma de profilaxia para prevenção de epidemias (RÁBAGO-CASTRO et al., 2006).

Segundo Zagatto (1995), durante muito tempo foi aplicado quase que diariamente o  $\text{CuSO}_4$ , numa quantidade aproximada de quatro toneladas por dia, no controle de algas cianofíceas do reservatório Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. Mozeto e Zagatto (2006) descrevem que, embora o cobre aplicado se complexe e acabe sendo carregado para o fundo, depositando-se no sedimento, é frequente encontrar residual de cobre dissolvido nas águas do reservatório, principalmente, nas regiões onde a aplicação é mais intensa.

Em relatos obtidos após entrevista com técnicos e/ou piscicultores de agroindústrias no estado de São Paulo, SP, Brasil, o uso de  $\text{CuSO}_4$  ocorre tanto com o objetivo profilático no controle de infestações de parasitas branquiais, como na busca da melhoria das condições da água dos viveiros que, em decorrência da intensidade de arraçamento e da elevada densidade de cultivo, podem ficar com excesso de partículas dissolvidas. Os banhos terapêuticos, segundo estes relatos, chegam a ser feitos aplicando-se nos viveiros  $\text{CuSO}_4$  em doses de até  $600\text{g.m}^{-2}$  ( $150\text{ mg.L}^{-1}\text{ Cu}^{2+}$ ). Em parte destas constatações consta também que a aplicação em

viveiros de cimento, nesta mesma concentração, causou mortalidade em 100% dos animais e que quando aplicados em viveiros de terra os animais chegaram a vir à superfície mostrando dificuldade respiratória.

Carvalho e Fernandes (2006) concluíram que o uso do  $\text{CuSO}_4$  no controle de algas e parasitas de peixes deve considerar a sensibilidade da espécie ao cobre e principalmente o pH da água dos viveiros de aquicultura. Além disso, os mecanismos bioquímicos em resposta à exposição ao cobre buscam restabelecer a homeostase e ocorrem, muitas vezes, no lugar de outras funções fisiológicas, interferindo no ganho de peso e crescimento, comprometendo a eficiência produtiva.

A toxicidade do cobre tem sido estudada em muitas espécies de peixe, sendo influenciada não só pela concentração do metal na água, mas também, por vários fatores que interferem na sua biodisponibilidade ao organismo exposto. As concentrações letais (CL50) de cobre para peixes de água doce variam intra e inter espécie. Na variação inter espécie, para o  $\text{CuSO}_4$ , verificam-se valores de poucos  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a alguns  $\text{mg.L}^{-1}$ . Os dados apresentados na publicação do EPA (ESTADOS UNIDOS, 2007) mostram a amplitude de variação com valores de  $18 \mu\text{g.L}^{-1}$  para “northern squawfish”, *Ptychocheilus oreg*, (ANDROS; GARTON, 1980) a  $84600 \mu\text{g.L}^{-1}$  para “golden shiner”, *Notemigonus crysoleucas* (HARTWELL et al., 1989). Muitas vezes a CL50 varia para uma mesma espécie, como no caso do “fathead minnow”, *Pimephales promela*, sendo que foram citadas CL50 de  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$  (SCHUBAUER-BERIGAN et al., 1993) a  $1485,90 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ERICKSON et al., 1996). Estudos como o de DeBoeck et al. (2004) mostraram que a exposição ao cobre foi altamente tóxica à truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, com CL50 (96 h) de  $210 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Por outro lado, a exposição crônica desta mesma espécie em fase juvenil, a  $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$  por 28 dias, não teve efeito no crescimento ou no consumo alimentar dos indivíduos expostos.

Variações na toxicidade crônica de cobre entre as espécies de peixes, estágios de vida e qualidade da água foram verificados por Brix et al. (2001). Estas grandes variações são decorrentes da fase de vida, do tamanho do indivíduo exposto e das características físico-químicas

da água. As concentrações usuais, segundo Boyd e Massaut (1999), variam de 0,5 a 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de cobre. As recomendações práticas do uso de CuSO<sub>4</sub> em piscicultura são baseados somente na alcalinidade da água. De acordo com Wurts e Durborow (1992), o cobre não deve ser aplicado em águas com alcalinidade menor que 20 mg.L<sup>-1</sup>, preservando assim a vida dos peixes no viveiro.

Concentrações excessivas podem resultar em acúmulo do excesso do íon cobre e subsequente toxicidade, o que pode indiretamente reduzir o crescimento, a reprodução e a alimentação dos organismos expostos (BOYD, 1990). As variações nas recomendações técnicas baseadas na alcalinidade e na diversidade de dados resultantes dos testes de toxicidade, incoerentes com as aplicações praticadas na aquicultura mundial, demonstram que a utilização do CuSO<sub>4</sub> vem sendo feita de forma irregular, pois muitas vezes não são observados os parâmetros físicoquímicos da água de uso.

A qualidade da água nos viveiros de cultivo de organismos aquáticos, principalmente de piscicultura, é afetada por interações dos diversos componentes químicos presentes neste ambiente. O pH dos viveiros varia diariamente devido à respiração e fotossíntese e quanto maior a concentração de organismos que liberam CO<sub>2</sub> na água, maior a oscilação deste parâmetro (WURTS; DURBOROW, 1992). Alguns autores descrevem a importância de se verificar as condições da água dos viveiros antes da aplicação do CuSO<sub>4</sub>. Muitos destes alertas estão relacionados às características de diminuição do oxigênio dissolvido (OD) em consequência da presença e da mortalidade das algas, demonstrando então a possibilidade de, no momento da aplicação destes compostos, o OD e o pH estarem diminuídos.

Wurts e Durborow (1992) descrevem que se um vasto bloom de algas cobrir grande parte do viveiro, não é recomendado o uso de CuSO<sub>4</sub>, pois este tratamento irá provavelmente causar morte repentina das algas, podendo resultar em diminuição de OD, decorrente desta mortalidade, sufocando os peixes. Boyd (1998) também alerta para as aplicações de CuSO<sub>4</sub> em viveiros onde a superfície da água estiver

coberta com plantas aquáticas em mais de 2/3. Porém, Boyd (1998) indica aplicações sucessivas deste composto de maneira a eliminar gradualmente estas macrófitas, evitando depleção de OD em função da decomposição destas. Este mesmo autor alerta ainda que assim que a concentração de cobre diminuir a níveis sub-letais para estes organismos, eles voltam a crescer, cobrindo novamente a superfície do viveiro. Assim, esta prática deve ser feita periodicamente, evitando o crescimento destes organismos indesejáveis, caracterizando esta ação como prática sucessiva.

Na aquicultura, devido ao baixo tempo de residência do íon cobre na coluna d'água, há grande propensão deste íon se acumular nos sedimentos dos viveiros de cultivo. Han et al. (2001) verificaram que viveiros de piscicultura que receberam aplicações periódicas de  $\text{CuSO}_4$  acumularam cerca de  $40 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ Cu}$  para cada  $1 \text{ kg.ha}^{-1}$ . As aplicações sucessivas destes compostos podem levar ao excesso de íon cobre no sedimento, e a maior preocupação com este excesso é que ainda não se compreende como age este "reservatório" de cobre, pois, acredita-se que ele não é só depósito de materiais, mas sim um compartimento ativo que intercambia espécies, contaminantes ou nutrientes com a coluna d'água (MOZETO; ZAGATTO, 2006).

## 1.2 Toxicidade do cobre

### 1.2.1. Conceitos de Toxicologia e Biomarcadores

Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo a interação entre substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (PLAA, 1982). Nos testes de toxicidade, são estudadas as relações entre a dose de um poluente e seus efeitos nos organismos expostos. Inicialmente, os testes avaliam o efeito na sobrevivência dos organismos em estudo e posteriormente avaliam os efeitos da exposição a concentrações sub-letais, na tentativa de compreender os mecanismos que auxiliam os organismos a sobreviverem à exposição

aos xenobióticos. Muitas biotransformações em enzimas ou outras proteínas são induzidas pela exposição a diferentes tipos de poluentes, formando a base para a utilização dos biomarcadores.

Linvigstone (1993) considera como biomarcadores os fluídos corpóreos, as células ou os tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, exposição a xenobiótico. Depledge (1993) caracteriza ainda como biomarcador as variações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que podem ser mensuradas em amostras de tecidos ou fluídos corporais. Unâimes são os autores em apontar que as diferenças nestes biomarcadores fornecem evidências da exposição ou efeitos de um ou mais poluentes químicos. Existem biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes. Os biomarcadores podem ser classificados como de exposição ou de efeitos. Um biomarcador de exposição será qualquer alteração biológica mensurável que evidencie a exposição dos organismos a um poluente, exemplificado pela atividade das enzimas antioxidantes (WINZER et al., 2001) ou pela concentração de metalotioninas (MCCARTHY; SHUGART, 1990). Biomarcadores de efeito serão aqueles que evidenciam algum efeito tóxico associado à exposição do organismo ao poluente, assim como, a peroxidação de lipídeos ou danos no DNA (VAN DER OOST, 2003).

O estudo dos biomarcadores frente à exposição a xenobióticos nos permite descrever de maneira adequada efeitos induzidos por vários estressores ambientais em qualquer nível de organização biológica, do nível celular ao ecossistema. Deste modo, um biomarcador é um indicador da qualidade do ambiente, considerado como resposta biológica a químicos e que fornece a extensão da exposição do efeito tóxico. Os biomarcadores são mais comumente usados em exposições de indivíduos a diferentes concentrações sub-letais. Porém, a concentração de um biomarcador bioquímico em um dado tecido também pode variar em resposta a características intrínsecas do organismo, como a fase de desenvolvimento e a idade (HYNE; MAHER, 2000). Outro aspecto importante a ser considerado quando

se avaliam efeitos induzidos por contaminantes químicos à biota é que, nos sistemas aquáticos naturais, os organismos podem estar expostos não a um único contaminante, mas sim, a uma miríade ou mistura de diferentes substâncias (RAND et al., 1995).

Os efeitos tóxicos das substâncias dependem de muitos fatores, incluindo a natureza do químico, a via de exposição, o local de ação, as vias metabólicas e a dose. Fundamentalmente, todos os efeitos tóxicos envolvem mecanismos moleculares e só podem ser entendidos se estes mecanismos forem conhecidos. A toxicidade se inicia com a interação com o alvo bioquímico. Segundo Mazon e Fernandes (2001), a relação entre o ambiente aquático e a superfície epitelial implica em que o tecido branquial, a pele e o intestino sejam os primeiros a entrar em contato com os poluentes, tornando estes órgãos potenciais indicadores da qualidade ambiental.

Para a compreensão dos efeitos de poluentes como metais, são fundamentais os estudos da assimilação, acumulação e excreção destes poluentes em organismos aquáticos. O termo biodisponibilidade varia consideravelmente e é normalmente específico a certas situações. Porém, uma definição genérica e usual é a relativa facilidade com que o químico é transferido do ambiente a uma localidade específica nos organismos de interesse. A biodisponibilidade, entre outros fatores, é diretamente influenciada pela forma química do componente avaliado (MCDONALD et al., 1989).

A superfície ativa dos metais na água é altamente dependente da química da água (MCDONALD et al., 1989). Entre os fatores mais importantes estão o pH, a dureza e a capacidade complexante do metal. A caracterização físico-química da água pode interferir diretamente na influência do cobre para os organismos. Sunda e Lewis (1978) descreveram que a presença de quelantes reduz a toxicidade do cobre por meio da formação de complexos biológicos indisponíveis. O efeito dos quelantes na redução da toxicidade do cobre para fitoplâncton foi demonstrado por Erickson et al. (1970) e Davey et al. (1973). Para Grosell et al. (2007), grande parte da variação dos efeitos

do cobre é atribuída ao tamanho do peixe. De acordo com Blust et al. (1991), não há relação direta entre a concentração de cobre no meio e sua tomada e toxicidade. A dureza da água também pode afetar a toxicidade de vários poluentes, especialmente de metais. Geralmente, metais são menos tóxicos em águas mais duras, desde que o pH seja mantido constante (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

### **1.2.2. Mecanismos de ação e fatores que influenciam a toxicidade do cobre**

A toxicidade do cobre varia em relação a aspectos do ambiente de exposição, da sua forma química e em relação ao organismo e espécies expostas. Os mecanismos pelo qual o cobre irá agir no organismo a ele submetido dependerão inicialmente de sua absorção, o que diretamente afetará sua toxicidade. Porém acredita-se que, uma vez absorvido, o cobre induza a vários danos que podem levar à morte do organismo (SANCHEZ et al., 2005). Pesquisas realizadas com a exposição de diversas espécies de peixes ao cobre demonstraram que não somente sua absorção, mas a luta contra a absorção do cobre causa distúrbios nestes organismos aquáticos.

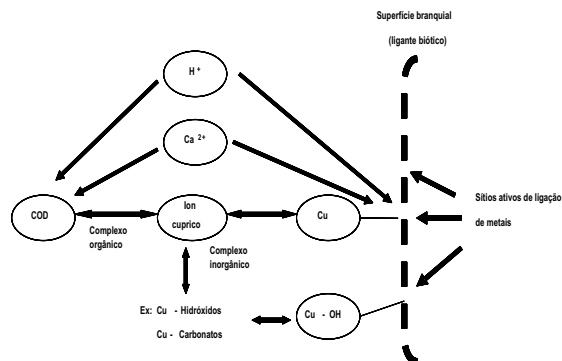
Existe grande influência do meio na absorção do cobre, pois ele compete com outros metais pelos sítios ativos de ligação nas brânquias. Há também a influência das características do meio aquático nas formas químicas do cobre, o que influencia diretamente sua biodisponibilidade e, indiretamente, seus efeitos nos organismos, pois irá interferir na captação do metal do meio. Os efeitos dos fatores físico-químicos que afetam a toxicidade do cobre são muitos e a especificidade química da água de exposição irá determinar se existirá efeito na especificidade do cobre e dos resultados da forte relação da toxicidade do cobre livre.

Em águas com concentrações adequadas de oxigênio, o cobre livre existe na forma de  $\text{Cu}^{2+}$ , fracamente associado com moléculas de água ( $\text{Cu} \cdot n\text{H}_2\text{O}^{+2}$ ) mas, esta espécie normalmente representa a menor porcentagem do cobre total. Muito do cobre dissolvido é parte de complexos fortes com vários ligantes, incluindo compostos orgânicos

dissolvidos, hidróxidos, carbonatos e outros ligantes inorgânicos (ESTADOS UNIDOS, 2007). A diversidade de formas químicas que o cobre apresenta na água, torna complexa sua forma de absorção pelos organismos e a compreensão da sua biodisponibilidade. O modelo proposto por Pagenkopf (1983) é, atualmente, a base para a compreensão dos mecanismos de ação do cobre (ESTADOS UNIDOS, 2007) nos organismos aquáticos. Este modelo (Figura 1) descreve a complexidade da ação do cobre, influenciado diretamente pela caracterização do ambiente aquático. Os estudos da toxicidade deste metal priorizam, ainda, a relação entre a existência de um ligante biótico neste contexto. Este ligante é representado pelas brânquias, por sítios de ligações nelas presentes e por sua complexidade química que também interfere na toxicidade do metal, caracterizando assim o Modelo Biótico Ligante (BLM, sigla em inglês).

Reações que ocorrem entre soluções podem afetar a forma e abundância em que uma espécie química, em particular uma substância, está presente e, conseqüentemente, pode influenciar a toxicidade direta que uma dada concentração total desta substância tem para organismos aquáticos. Isto parece ser o caso de soluções contendo cobre onde muito do cobre  $\text{Cu}^{2+}$  combina-se com outros compostos (SHAW; BROWN, 1974). A influência da especificidade do cobre decorrente da sua forma química é apresentada em vários estudos. Campbell et al. (1999) descrevem que a tomada de cobre pelas brânquias da truta arco-íris segue um modelo cinético, relativo à redução do  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  e que estas alterações ocorrem antes mesmo do contato com a membrana de transporte. Bogdanova et al. (1999) descreveram a possibilidade desta redução ocorrer na superfície da membrana extracelular sendo catalisado por substâncias com grupamento sulfidríla.





**Figura 1.** Diagrama conceitual das formas químicas do cobre e do modelo-branquial de ligação do cobre. Adaptada de Pagenkopf, 1983.

De acordo com Grosell et al. (2002; 2007), a concentração de cobre em ambientes aquáticos não é o único fator que dita a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos. Muitos autores relatam que a toxicidade do cobre varia em função das mudanças nas características físicoquímicas da água de exposição, tais como temperatura, compostos orgânicos dissolvidos, partículas suspensas, pH e vários cátions e ânions inorgânicos, incluindo os que determinam dureza e alcalinidade.

Normalmente, a toxicidade do cobre é reduzida pelo aumento na dureza da água (SPRAGUE, 1968; HUNT, 1987; CAMPBELL, 1995; ALLEN; HANSEN, 1996) que é composta de cátions (principalmente de cálcio e magnésio) que não interagem diretamente com o cobre em solução para reduzir sua biodisponibilidade. Em muitos casos, o efeito aparente da dureza na toxicidade pode ser parcialmente em função da complexação do cobre com altas concentrações de hidróxidos e/ou carbonatos (aumento do pH e da alcalinidade) normalmente associados com alta dureza (INGLIS; DAVIS, 1972; CHAKOUMAKOS et al., 1979; MILLER; MACKAY, 1980; ERICKSON et al., 1987).

Existem evidências de que a toxicidade do cobre é afetada pelas condições de exposição cujos efeitos lhe são atribuídos por interferirem

na sua biodisponibilidade. Entretanto, não pode ser presumido que todos os efeitos observados dos fatores físico-químicos na toxicidade do cobre refletem na biodisponibilidade ou que o efeito na biodisponibilidade é devido somente à complexação e competição com os cátions pelos ligantes. O efeito varia em função do tipo de metal e da água. Portanto, em estudos ecotoxicológicos é necessário considerar a dureza da água.

Neste sentido Aragão et al. (2003) avaliaram a dureza total das águas superficiais do Estado de São Paulo. Os resultados obtidos permitiram classificar essas águas como moles, com dureza média de  $31 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  e possibilitaram justificar a utilização de água mole para a realização de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos no Estado. Assim, dependendo da química da bacia hidrográfica, sistemas caracterizados por apresentarem baixa dureza normalmente contêm uma variedade de ligantes, tais como bicarbonato, flúor, sulfato, ácidos fúlvico e húmico. Muitos destes ligantes irão formar complexos relativamente estáveis, diminuindo a toxicidade dos metais. Sabe-se ainda que não somente a dureza e alcalinidade ditarão se o cobre estará mais ou menos biodisponível pois, o pH, temperatura, quantidade de material ligante entre outras características influenciarão na toxicidade deste metal.

Segundo Cassee et al. (1998), a interação entre compostos pode interferir em mecanismos do sistema biológico como no próprio processo de absorção, na distribuição, no metabolismo e na excreção ou até mesmo na toxicodinâmica, agindo nos receptores químicos destes. Grande (1967), por exemplo, relatou que quando peixes salmonídeos foram expostos ao cobre, em águas altamente moles, a toxicidade do cobre foi reduzida quando substâncias húmicas estavam presentes. Baixos níveis de nitrogênio, contendo ácidos orgânicos com propriedades quelantes, também reduziram a toxicidade de soluções de sais de cobre (SPRAGUE, 1968).

Assim, acredita-se que existam fatores que interferem na forma química em que o cobre está presente na água, outros que irão modificar sua absorção por alterarem sua forma química na superfície de absorção, os que competem com este metal pelos mesmos sítios de ligação na

superfície de absorção e fatores que indisponibilizam o cobre por se associarem a ele. Devido às dificuldades e limitações em se determinar e avaliar os metais e suas ações, tornaram-se necessárias pesquisas que mostrassem e quantificassem os efeitos de parâmetros da qualidade da água que modificam a toxicidade de cada metal.

As brânquias dos peixes são a principal via de absorção de metais, representando uma vasta área de superfície (MCKIM, 1994). A especificidade do metal no microambiente pode ser alterada pela secreção de muco branquial, pois o epitélio branquial é normalmente coberto com uma matriz extracelular contendo uma variedade de glicoproteínas (TAO et al., 2002). Assim, os metais podem se ligar ao muco branquial diminuindo sua disponibilidade (VARANASI; MARKEY, 1978).

O pH no microambiente da superfície branquial é diferente do pH da água do ambiente ao seu redor devido à influência das liberações de amônia, dióxido de carbono e outros compostos (LIN; RANDALL, 1990). Tem sido adotado, portanto, que mudanças na biodisponibilidade dos metais podem ser decorrentes das mudanças do microambiente branquial. Estas mudanças são associadas basicamente às alterações do pH deste microambiente e da complexação dos metais com o muco. Porém, estes dois fatores respondem a mudanças no pH do ambiente (TAO et al., 2002).

TAO et al. (2000) verificaram que, em carpa comum, *Cyprinus carpio*, a perda de carbono orgânico, que indiretamente corresponde ao muco branquial quando determinada na água que passou pelas brânquias, aumentou exponencialmente em resposta ao aumento de cobre aquático em pH ácido. O muco protetor é continuamente lavado pelo fluxo de água na respiração (TAO et al., 2000; TAKASUSUKI et al., 2004) e reposto por novo muco secretado pelas células.

Pelgrom et al. (1995) expuseram a tilápia mossâmbica a níveis de cobre (50, 100 e 200  $\mu\text{g. L}^{-1}$ ) resultando em aumento significativo da concentração de cobre nas brânquias e no plasma, de modo

mais proeminente nos peixes expostos a  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Estes mesmos autores afirmaram que somente o plasma e não as células sanguíneas apresentou elevada concentração de cobre, indicando que muito do cobre que entra pelas brânquias é transportado pelo plasma. Estes resultados indicaram haver ceruloplasmina no sangue da tilápia sendo esta a principal proteína transportadora do cobre na corrente sanguínea. Entretanto, não houve direta relação entre a concentração de ceruloplasmina plasmática e concentrações de cobre na água.

Paris-Palacios et al. (2000) não encontraram linearidade entre a bioconcentração de cobre e sua concentração na água. Em “snakehead”, *Chana sp.*, e “killifish”, *Fundulus heteroclitus*, a bioconcentração diminuiu com o aumento do cobre ou de outros metais na água (SEGNER; BRANUBECK, 1990). De acordo com estes autores, os peixes não desenvolvem regulação das ligações com metais abaixo de certas concentrações e baixas concentrações de metais na água podem resultar em alta bioacumulação. Estudos na cinética da toxicidade do cobre em truta arco-íris sugerem rápida eliminação do cobre. Assim, a concentração plasmática deve alcançar situação de equilíbrio após poucas horas ou dias (CARBONELL; TARAZONA, 1994).

### 1.2.3. Influência do pH aquático na toxicidade do cobre

O pH é definido como o logaritmo negativo (co-log) da concentração de íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) e, de modo simples, indica quão ácida ou básica está a água. Águas com  $\text{pH} = 7,0$  são consideradas neutras. Abaixo deste valor são caracterizadas como ácidas e acima de 7,0 básicas. O pH da maioria dos tanques de cultivo de água doce estão entre 6,0 e 9,0, podendo variar diariamente em até dois pontos (BOYD, 1998). Vários fatores, como a poluição ambiental e a chuva ácida, afetam o pH aquático (HEATH, 1991). Tanto o pH alto quanto o baixo são potencialmente tóxicos para peixes, conforme exemplificado na Figura 2. Existe uma faixa ideal de pH (6,5 a 9,0) para a sobrevivência da maioria dos peixes e abaixo ou acima dela, mecanismos bioquímicos e fisiológicos podem ser acionados na busca de sobrevivência a esta adversidade.

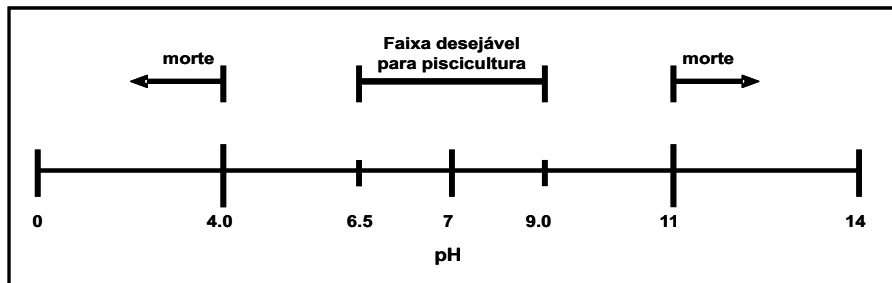


Figura 2: Escala de pH, mostrando a faixa recomendável para piscicultura. (Adaptado de Wurts e Durborow, 1992).

O pH tem efeito marcante na forma química em diversas substâncias potencialmente tóxicas e, conseqüentemente, pode ter grande influência na toxicidade. Stiff (1971) relatou que substâncias alcalinas inorgânicas ligam-se ao  $\text{Cu}^{2+}$  em pH neutro ou alcalino. Por outro lado, a diminuição no pH libera íon cúprico deste complexo. Muitos fatores bióticos e abióticos influenciam a biodisponibilidade e a toxicidade dos metais para organismos aquáticos. Além disso, as relações entre fatores que afetam a toxicidade nem sempre são lineares. Por exemplo, o pH baixo pode tanto aumentar como diminuir a toxicidade de metais em ecossistemas de água doce (CAMPBELL; STOKES, 1985). Os efeitos do pH aquático na atividade dos metais são complexos, uma vez que o pH afeta tanto a solubilidade quanto a especificidade de muitos metais (MCDONALD et al., 1989).

Dentre os efeitos das características químicas da água na toxicidade dos metais, o fator pH é o mais complexo de ser compreendido (MCDONALD et al., 1989). Os efeitos do pH na toxicidade do cobre são de particular importância em águas moles e de baixa alcalinidade, como a maioria das águas continentais brasileiras. Em água dura, a toxicidade do cobre é menor devido a complexação com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ . (PLAYLE et al., 1992), enquanto que em águas moles, que têm baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e têm baixo poder tampão, acredita-se que a toxicidade do cobre seja maior, especialmente em baixo pH. A dureza da água, altos valores de pH ou baixa alcalinidade reduzem a letalidade

do cobre para os peixes (ZITKO; CARSON, 1976; HOWARTH; SPRAGUE, 1978; ERICKSON et al., 1996) mas, em pHs menores que 6,5, hidróxidos de cobre tóxicos são formados (STOUTHART et al., 1996).

O cobre e o pH baixo parecem ser similares no mecanismo de toxicidade pois, ambos são caracterizados por causar produção excessiva de muco e sua precipitação nas brânquias, sendo a morte então atribuída por asfixia. O baixo pH inibe a absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  através das brânquias e estimula a difusão passiva do efluxo destes íons (WOOD, 1989; 2001). O cobre também inibe a absorção de íons e favorece sua perda, o que pode aumentar os efeitos do pH (WOOD, 2001; MAZON et al., 2002a). Estudos realizados em água doce, onde as mudanças de concentração dos íons hidrogênio são mais pronunciadas, mostraram que a formação de complexos do cobre com ligantes orgânicos diminuem a sua absorção e toxicidade (DODGE; THEIS, 1979; GUY; KEAN, 1980; BORGMANN; RALPH, 1983; BUCKLEY, 1983; STARODUB et al., 1987). Entretanto, também foi demonstrado que a absorção e toxicidade do cobre aumentou com a diminuição da concentração de íons hidrogênio, diminuindo a concentração de íons cúprico (ANDREW et al., 1977; HOWARTH; SPRAGUE, 1978; CHAKOUMAKOS et al., 1979; MILLER; MACKAY, 1980; CUSIMANO et al., 1986; LAURÉN; MCDONALD, 1986; STARODUB et al., 1987). Nestas circunstâncias, acredita-se não haver relação direta entre a concentração de íons cúprico na solução e a absorção e toxicidade deste metal em organismos aquáticos (BLUST et al., 1991).

O pH pode alterar a biodisponibilidade do cobre de três maneiras distintas: (1) modificando a forma química do metal na solução; (2) modulando a atividade do sistema de transporte do metal e (3) modificando processos fisiológicos que influenciam direta ou indiretamente os processos de tomada do metal (ex. alterando os potenciais de membrana, regulação osmótica e iônica; metabolismos energéticos) (WILLIAMS, 1981; VIARENGO, 1989). Em ambientes ácidos, a forma mais biodisponível do cobre é o cátion livre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (LAURÉN; MCDONALD 1985; 1986; TAO et al., 2000; 2002). Já em

água com pH alcalino, a forma mais biodisponível é o complexo de hidróxido de cobre ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) (PLAYLE et al., 1992; TAO et al., 2002).

Em ambientes básicos o cobre é complexado com hidrogênio e carbonato, mas em ambientes ácidos os íons cúprico e algumas espécies inorgânicas (ex:  $\text{CuCl}^+$  e  $\text{CuSO}_4$ ) tornam-se mais importantes. Para a mesma concentração de  $\text{CO}_2$  dissolvido, o complexo com o carbonato é importante em um ambiente básico mas não em ambiente ácido (BLUST et al., 1991). Por isto, é esperada maior toxicidade do cobre em pH ácido e menor em pH alcalino.

Os resultados da exposição do crustáceo eurialino artêmia, *Artemia franciscana*, a concentrações crescentes de cobre mostraram que a absorção deste metal aumentou linearmente em relação à sua concentração na solução e que este fato foi maior em água básica e neutra, quando comparado à água ácida (BLUST et al., 1991). Estes mesmos autores explicam que o efeito dos íons hidrogênio na absorção do metal é expresso como ionização do sistema de transporte do metal, ressaltando que alterações no pH do meio modificam o processo de absorção do cobre. A protonação dos sítios de ligação envolvidos no sequestro e transporte do cobre é exemplo da modificação causada pelas alterações na concentração de íon hidrogênio no mecanismo de absorção do cobre. Por isto, a protonação aumenta a absorção e biodisponibilidade dos íons cúprico livres e/ou outras espécies de íons cúprico com alterações do pH. Uma vez que mudanças na concentração de íons cúprico e na concentração de hidróxidos cúpricos são dependentes de pH, não é experimentalmente possível, de forma clara, separar os efeitos do pH na especificação do metal do efeito do pH no processo de absorção dos metais.

Menezes (2005) encontrou para o tambaqui, *Colossoma macropomum*, uma CL50 (96 h) de  $2,68 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Cu}$  em pH 4,0. Este valor é quatro vezes maior do que o estimado por Oliveira (2003) para a mesma espécie, porém em pH 7,3. Outros resultados demonstraram que o curimatá, *Prochilodus scrofa*, apresentou maior sensibilidade ao cobre em pH 8 ( $15 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ), se comparado com o valor de CL50 em pH 4 ( $200 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (TAKASUSUKI et al., 2004).

Carvalho e Fernandes (2006) avaliaram a toxicidade do cobre em curimatá e obtiveram valores de CL50 (96 h) de 98 e 88  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em pH 4,5 e 16 e 14  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em pH 8,0, nas temperaturas de 20 e 30°, mostrando que esta espécie foi mais sensível ao cobre em pH básico que em pH ácido, nas duas temperaturas, concluindo que a toxicidade do cobre para esta espécie depende do pH da água, corroborando os achados de Takasusuki et al. (2004). Os achados de Cusimano et al. (1986) também confirmaram que os efeitos do cobre em pH ácido diminuíram para truta arco-íris. Carvalho e Fernandes (2006) sugeriram que a diminuição da toxicidade do cobre em pH ácido pode ser decorrente da competição do  $\text{H}^+$  e do  $\text{Cu}^{2+}$  pelo mesmo sítio de ligação no epitélio branquial (LAURÉN; MCDONALD, 1985), que é a principal superfície corporal de difusão água-sangue (MAZON et al., 2002a).

Çogum e Kargin (2004) avaliaram a bioconcentração do cobre no fígado, brânquias e músculo da tilápia do Nilo em diferentes pHs (5,5, 7,8 e 9,5) por 7, 15 e 30 dias, nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0  $\text{mg.L}^{-1}$ . Estes autores verificaram que em todos os pHs testados o acúmulo de cobre nos tecidos aumentou, significativamente, com o aumento de cobre na água e com o tempo de exposição. O acúmulo de cobre nos tecidos dos peixes expostos ao pH ácido foi maior do que o dos peixes expostos aos outros valores de pH.

Takasusuki et al. (2004) verificaram que, em curimatá, a exposição a concentrações crescentes de cobre aumentou o acúmulo deste metal no plasma, em pH alto e baixo. Porém, em pH 4,5 a concentração no plasma foi maior que em pH 8,0. As maiores concentrações, após 96 h de exposição, ocorreram nas brânquias e plasma com valores 250% maiores que no grupo controle.

#### **1.2.4. Influência do oxigênio dissolvido na toxicidade do cobre**

##### **a. Compreendendo os conceitos do metabolismo oxidativo**

O oxigênio, no seu estado molecular ( $\text{O}_2$ ), é essencial para muitos processos metabólicos vitais, forçando a vida aeróbica a resistir a



uma notável toxicidade caracterizada pelo chamado “paradoxo da vida aeróbica” (AHMAD, 1995). Os organismos aeróbicos são, muitas vezes, sujeitos a variações na concentração de oxigênio no meio (DAVIES, 2000). O paradoxo do oxigênio é derivado de sua natureza química. Na sua forma atômica (O), o oxigênio é um radical livre e na sua forma molecular ( $O_2$ ) é um bi-radical livre (DAVIES, 2000), caracterizado por possuir um elétron não pareado na sua camada atômica mais externa. Quando dois átomos de oxigênio combinam para formar uma molécula de oxigênio, seus elétrons permanecem como dois elétrons não pareados. Esta natureza de bi-radical permite a reação de oxidação/redução. A redução tetravalente do oxigênio, catalisada pela citocromo c oxidase no final da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, produz água. Entretanto, reduções monovalentes geram diversos intermediários reativos, comumente conhecidos como espécies reativas do oxigênio (EROs) (SIES, 1986). Se um único elétron é aceito pela molécula de  $O_2$  ele deve atingir um dos orbitais mais externos, obtendo como produto o radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ). Além da origem comum no metabolismo aeróbico (FRIDOVICH, 1975), outra fonte importante de  $O_2^{\bullet -}$  é o “burst respiratório” das células fagocíticas quando estas entram em contato com partículas invasoras.

Adicionando-se um segundo elétron ao  $O_2^{\bullet -}$  ocorre a formação do íon peróxido  $O_2^{2-}$  que não possui elétron não pareado e não é um radical, mas é capaz de gerar novos pró-oxidantes (DRÖGE, 2002). Qualquer  $O_2^{2-}$  formado em pH fisiológico irá imediatamente sofrer protonação, gerando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Em soluções aquosas o  $O_2^{\bullet -}$  sofre a reação de dismutação para formar  $H_2O_2$  e  $O_2$ . A taxa de dismutação é mais rápida em valores de pH mais ácidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984).

A ruptura hemolítica de O-O do  $H_2O_2$  produz dois radicais hidroxilas ( $\bullet OH$ ) que possuem alta taxa de reação com grande parte das moléculas encontradas nos organismos vivos. A reatividade do  $\bullet OH$  é tão alta que se os  $\bullet OH$  forem formados em organismos vivos irão reagir imediatamente com moléculas biológicas ao redor, produzindo

radicais secundários com reatividade variada. Um sistema biológico que produz  $O_2^{\bullet -}$  provavelmente produzirá  $H_2O_2$ , a não ser que o  $O_2^{\bullet -}$  reaja imediatamente com outra molécula, por meio da reação de dismutação. A taxa na qual isto ocorre depende do pH, da concentração de  $O_2^{\bullet -}$  e da ação de mecanismos de defesa. Acredita-se que os radicais hidroxila são os responsáveis por danos celulares que incluem peroxidação lipídica em membranas, oxidação direta de proteínas e clivagem de moléculas de DNA e RNA (PENA et al., 1999).

A oxidação biológica é um processo primitivo e, em face da inevitável consequência da toxicidade do  $O_2$ , a evolução proporcionou estratégias apropriadas de defesa para sobreviver ao “paradoxo do oxigênio”. Quando formas mais complexas da vida aeróbica se desenvolveram, a elaboração de defesas antioxidantes se diversificou e se adaptou a novas situações. A primeira linha de defesa é composta por substâncias antioxidantes como a vitamina C, E, o ácido úrico, glutathione e carotenóides. Além do mais, diversas enzimas de defesa antioxidantes (DAs) previnem a cascata oxidante, reagindo, interceptando e inativando os EROs, encerrando o ciclo da peroxidação lipídica. As enzimas antioxidantes são cruciais no esforço em conter a toxicidade do oxigênio, quando o suprimento de outros compostos antioxidantes está escasso ou esgotado (AHMAD, 1995), atuando ainda em conjunto com estes compostos. O estresse oxidativo (EO) ocorre quando a taxa de geração de EROs excede a da sua remoção (SIES, 1986), podendo haver excesso na produção de EROs em níveis que comprometem a capacidade destes compostos em combater sua formação ou até mesmo a inibição destes mecanismos. Os efeitos deletérios do EO incluem a oxidação de proteínas, DNA e componentes esteróides, assim como, a peroxidação de lipídeos na membrana celular. Esta reação produz hidroperóxidos de lipídeos (HP) instáveis, produtos que, em decomposição, são altamente reativos, ameaçando a integridade celular, perpetuando o ciclo de peroxidação (SIES, 1986). Muitos poluentes ambientais podem induzir o EO em animais aquáticos, incluindo os peixes e estes mecanismos vêm ganhando muita atenção no campo da ecotoxicologia (LEMAIRE et al., 1996).

## **b. Variações na concentração de oxigênio dissolvido na água e seu efeito na toxicidade do cobre**

Segundo Braum e Junk (1982), Saint-Paul (1984) e Val (1986) as oscilações extremas no oxigênio dissolvido no ambiente exigem dos organismos aquáticos, notadamente dos peixes, uma série de respostas adaptativas. Estas respostas envolvem desde manifestações comportamentais, como migrações laterais e o acionamento da respiração na superfície aquática, até o desencadeamento de ajustes fisiológicos e bioquímicos, com aumento do hematócrito e da taxa de hemoglobina, alterações enzimáticas e processos de regulação gênica.

A produção de EROs tem íntima relação com a proporção de  $O_2$  consumido pelo organismo. Neste sentido, mudanças na disponibilidade do  $O_2$  podem resultar em estresse oxidativo (WILHELM FILHO et al., 1993). Segundo Degroot e Littauer (1989), como a velocidade de formação dos EROs é proporcional ao consumo de  $O_2$  e à quantidade de mitocôndrias presentes no tecido, a expectativa inicial é de que situações de hipóxia resultem em diminuição da velocidade de geração de EROs. Entretanto, sob determinadas condições, a geração pode ser aumentada também durante estas condições. No caso de um quadro isquêmico ou mesmo hipoxêmico, onde o  $O_2$  está presente em concentrações que limitam sua redução para  $H_2O$  pela citocromo c oxidase, o aumento da capacidade de redução da cadeia respiratória, aliado ao acúmulo de co-fatores reduzidos (potencial redutor) nas células, pode aumentar a produção de  $O_2^{\bullet}$  pelos componentes da cadeia transportadora de elétrons (FREEMAN; CRAPO, 1982). Geralmente os aumentos destes intermediários reativos são acompanhados, compensatoriamente, por respostas dos sistemas de proteção antioxidantes enzimáticos (FREEMAN; CRAPO, 1981), evitando assim o EO.

Sabe-se que em órgãos de mamíferos submetidos à hipóxia e à reoxigenação ocorre aumento na produção de EROs causando oxidação dos componentes celulares, incluindo proteínas e lipídeos de membranas (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1985; KRAMER et al., 1994). Os elétrons liberados na cadeia respiratória mitocondrial são

reduzidos durante a isquemia. Entretanto, a reoxigenação imediata destes elétrons ocorre após o reinício do refluxo do  $O_2$ , reperfundindo o sistema, levando a superprodução de oxiradicais (RUUGE et al., 1991). Tais alterações não só terminam com o período de privação de  $O_2$ , mas também, com as consequências da reintrodução do  $O_2$  (STOREY, 1990; STOREY; STOREY, 1996). Por outro lado, animais que convivem naturalmente com alterações na disponibilidade de  $O_2$  podem apresentar adaptações bioquímicas. Se a potencialização da produção de EROs e da peroxidação lipídica são prejudiciais aos mamíferos em situação de isquemia e reoxigenação, isto pode ser também um problema para os peixes durante a volta de uma situação de hipóxia ou anóxia. Segundo Lushchak et al. (2001), os sistemas enzimáticos de defesa antioxidante são componentes chave do mecanismo bioquímico, que permitem a sobrevivência de certos moluscos e algumas espécies de vertebrados inferiores durante a anóxia/hipóxia seguida da reoxigenação. O aumento da atividade destas enzimas parece ser importante para a defesa contra a formação de EROs durante a reoxigenação nestas espécies.

Em relação a anóxia ou a hipóxia severa, existem relatos de que não é a redução de oxigênio per se, mas sim o retorno à normóxia que se constitui no fator mais crítico das oscilações de OD, influenciando diretamente o metabolismo oxidativo (BARRY, 1994). A resposta mais comum à hipóxia observada em peixes é o aumento das defesas antioxidantes, tanto enzimáticas quanto não enzimáticas. Este processo foi denominado por Hermes-Lima et al. (2001) como “preparação para o estresse oxidativo”. Luchchak et al. (2001) em douradinho, *Carassius auratus*, e Cooper et al. (2002), em “spot fish”, *Leiostomus xanthurus*, mostraram que a anoxia ativou as defesas antioxidantes, corroborando os achados de Víg e Necmcsók (1989), Hermes-Lima e Storey (1993; 1998), para ectotérmicos.

A concentração de oxigênio dissolvido na água varia constantemente até mesmo em condições naturais. Ações antropogênicas também contribuem para condições de hipóxia, pois a adição excessiva de compostos orgânicos no meio aquático resulta em *bloom* de algas e

microorganismos que podem causar alterações na concentração de OD, especialmente à noite, na fase escura da fotossíntese. Entretanto, a influência do OD na toxicidade foi muito estudada nas décadas de 60 e 70 mas, surpreendentemente, poucas pesquisas foram realizadas após este período (RATTER; HEATH, 1995).

Os peixes amazônicos possuem mecanismos que incluem modificações comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que permitem, até certo ponto, a sobrevivência dos indivíduos em ambientes hipóxicos (ALMEIDA-VAL et al., 1993; 1999). As respostas fisiológicas frente às reduções nos níveis de OD ocorrem via: (1) aumento da frequência ventilatória, volume ventilatório e redução na frequência cardíaca; (2) aumento no número de eritrócitos circulantes, taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito; (3) aumento na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio ajustado à proporção de fosfato inorgânico (NTP) e taxa de hemoglobina e ajustes no pH sanguíneo; (4) expressão de múltiplas hemoglobinas com diferentes propriedades funcionais; e (5) depressão do metabolismo (VAL, 1996). Os ajustes fisiológicos buscam favorecer a tomada de  $O_2$  e transferência para os tecidos. Tais ajustes são acionados assim que o animal detecta alterações na concentração de OD, via sistema sensorial ou via processos metabólicos (HOCHACHKA; SOMERO, 1984; WOOTTONM, 1990). Peixes oxi-reguladores são capazes de manter o aporte de  $O_2$  ao organismo até uma tensão crítica de  $O_2$  ( $PcO_2$ ), a qual varia entre as espécies. A partir desta  $PcO_2$  a tomada de  $O_2$  branquial diminui com sua redução no ambiente. As respostas fisiológicas buscam manter a concentração de oxigênio no sangue até que o custo da ventilação seja maior do que o ganho com o oxigênio tomado do ambiente (HOCHACHKA, 1980; JENSEN et al., 1993; JOBLING, 1994). Portanto, até a  $PcO_2$  da espécie, é esperado que as respostas fisiológicas e hematológicas à hipóxia mantenham os níveis de  $O_2$  adequados. No entanto, estes ajustes implicam em maior gasto de energia obtida por meio de reservas, como glicogênio, proteínas e lipídeos.

A baixa concentração de OD, condição característica de muitos rios poluídos, foi apontada por muitos autores por aumentar o efeito de tóxicos para peixes (LLOYD, 1961). De acordo com Berner (1981), os depósitos sedimentares e portanto, as formas químicas em que os metais se encontram, podem ser classificadas em função da concentração de OD no ambiente, mostrando a instabilidade dos minerais em função deste fator e as mudanças que irão ocorrer nos sistemas aquáticos, influenciando na toxicidade de diferentes metais pesados. Jackson (1984) avaliou a interação de diversos metais, entre eles o cobre, o zinco e o selênio e seus efeitos em organismos aquáticos, sugerindo haver alterações em função da predominância de condições aeróbias e anaeróbias nos sistemas naturais. Esta inter-relação foi exemplificada com resultados obtidos na interação cobre-zinco, havendo influência do zinco no acúmulo de mercúrio em concentrações hipóxicas, que não se modificaram na presença de maiores concentrações de OD. Lloyd (1961) demonstrou que a toxicidade aguda de zinco, cobre, chumbo, compostos fenólicos e amônia aumentou significativamente em águas com baixa concentração de OD. O fator principal para esta modificação foi a diminuição do OD, induzindo a um aumento na frequência respiratória, alterando o fluxo de água nas brânquias e, conseqüentemente, influenciando a absorção dos compostos tóxicos. A toxicidade do ácido sulfídrico para *Carassius auratus* aumentou 1,4 vezes quando em hipóxia (ADELMAN; SMITH, 1972). Esses achados demonstraram que as mudanças na toxicidade desses metais não se devem somente à concentração destas substâncias no meio.

Além das ocorrências naturais, a hipóxia em ambientes aquáticos pode também ser consequência de ações antropogênicas, aumentando sua frequência, duração e intensidade, resultando muitas vezes em diminuições da biodiversidade (CONNOLLY et al., 2004). Hanazato e Dodson (1995) observaram efeito sinérgico do carbanil ( $\text{CO.N.C}_6\text{H}_5$ ) e hipóxia em *Daphnia pulex*. Ferreira et al. (2008) avaliaram os efeitos das concentrações de OD na toxicidade do cádmio e do carbendazim (fungicida agrícola), para *Daphnia magna*. Descreveram que a exposição a condições agudas destes fatores resultou em

sinergismo, verificado principalmente na diminuição da CL50, com a diminuição gradativa do OD. Porém, estes autores ressaltaram que a interpretação das possíveis interações entre tóxicos e variações no OD devem ser cautelosas pois, a exposição à hipóxia implica em aumento de estresse. A hipóxia severa causa redução gradual de elétrons na cadeia mitocondrial, levando à formação incontrolada de EROs com consequente alteração no status redox (CHANDEL; SCHUMACKER, 2000). O acúmulo de metais também causa aumento de EROs como  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet -}$  e  $\bullet OH$ , culminando em estresse oxidativo (LIVINGSTONE, 2001; DAUTREMEPUITS et al., 2002). Este pode ser o motivo pelo qual, durante exposição de curto período à hipóxia, a *Daphnia* elevou as taxas ventilatórias e cardíaca levando ao aumento da absorção de cádmio (PAUL et al., 1998).

### **1.3 O uso de biomarcadores na exposição ao cobre e aos fatores que influenciam sua toxicidade**

#### **1.3.1. Metabolismo oxidativo**

Como todos os organismos, os peixes também são susceptíveis aos efeitos das EROs e possuem inerentes e efetivas defesas antioxidantes que já estão bem descritas na literatura (WILHELM FILHO et al., 2005; MARTÍNÉZ-ÁLVAREZ et al., 2005). Dentre os mecanismos de defesa destacam-se a atuação das enzimas antioxidantes. Dentre elas a enzima superóxido dismutase (SOD) que remove o  $O_2^{\bullet -}$  por meio da aceleração da reação de dismutação, transformando ânions superóxido em peróxido de hidrogênio (YIM et al., 1993). A SOD é de grande importância em permitir que os organismos sobrevivam na presença do  $O_2$  e tolerem aumentos na concentração de EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985). Yim et al. (1993) e Sanchez et al. (2005) acreditam que, por ser uma metaloenzima, a SOD apresenta rápida resposta à exposição ao cobre como resultado da ligação do metal à enzima. A catalase (CAT), enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio, está distribuída em praticamente todos os tipos celulares, principalmente no fígado e no sangue dos vertebrados superiores. Por possuir alto  $K_m$ , a CAT é dificilmente saturada pelo substrato (SCANDALIOS, 2005). Por

outro lado, altas concentrações de  $O_2^{\bullet -}$  podem inibir sua atividade (KONO; FRIDOVICH, 1982). A enzima glutathione peroxidase, GSH-Px, encontrada também em diferentes tecidos animais. Ela converte a glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG), utilizando como substrato o  $H_2O_2$  (GRISHAM, 1992).

Fatores como o comportamento, condições do ambiente e mudanças sazonais influenciam a atividade das enzimas das DAs. A atividade destas enzimas é tecido-específica. Alguns trabalhos citam atividades em tecidos diferentes e até mesmo ausência de atividade em alguns tecidos, como é o caso da atividade eritrocitária da CAT. Wdzieczak et al. (1982) demonstraram variação da atividade da CAT em muitas espécies de peixes de água doce e de água salgada. A maior atividade, entre os peixes de água doce, foi para a atividade da CAT eritrocitária da perca, *Perca fluviatilis*. Entretanto, Wilhelm Filho et al. (1993) relataram a ausência de atividade da CAT nos eritrócitos de outras espécies de peixes. Diferenças entre tecidos já foram relatadas por Wdzieczak et al. (1982), Radie et al. (1985a; 1985b), Wilhelm Filho et al. (1993) e Otto e Moon (1996). O epitélio das glândulas gasosas da bexiga natatória (MORRIS; ALBRIGHT, 1984) e da retina dos peixes (DESROCHERS; HOFFERT, 1983) apresentaram aumento da atividade da SOD, permitindo maior tolerância à toxicidade do oxigênio nestas estruturas. Algo similar foi encontrado no músculo vermelho, que normalmente mostra maiores atividades de SOD (MAZEAUD et al., 1979). Estes mesmos autores descreveram que as maiores atividades das DAs ocorrem nos tecidos mais oxidativos. Cassini et al. (1993) e Wilhelm Filho et al. (1993) encontraram correlação positiva entre enzimas antioxidantes e intensidade metabólica.

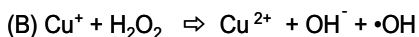
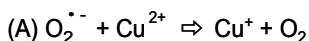
Nas últimas décadas as pesquisas em ecotoxicologia têm buscado evidências que associem a produção de EROs à contaminação ambiental. Sugere-se que os biomarcadores de estresse oxidativo possam ser utilizados em programas de monitoramento ambiental (MCCARTHY; SHUGART, 1990). Uma vez descoberta a importância de reações de radicais livres nos processos biológicos como mecanismos



que auxiliam na destoxificação de xenobióticos, várias pesquisas sobre processos pró-oxidantes e antioxidantes têm sido realizadas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

As águas residuais contêm uma variedade de poluentes orgânicos e metálicos. Muitos deles são fortemente oxidantes (AVCI et al., 2005). Ciprinídeos de água doce de áreas sabidamente poluídas mostraram sinais de estresse oxidativo, com aumento das atividades da SOD e CAT e maior peroxidação lipídica quando comparado aos peixes de áreas não poluídas. Pedrajas et al. (1995) acreditam que a indução da CAT e GSH-Px após exposição ao cobre indica que este metal induz espécies de HP no fígado, sendo que, provavelmente, o  $H_2O_2$  resultante da atividade da SOD foi a fonte para o subsequente aumento da atividade da CAT. Matés (2000) descreveu a capacidade da GSH-Px na destoxificação dos lipoperóxidos produzidos.

O cobre é requisito absoluto para o metabolismo aeróbico e, não obstante, é altamente genotóxico e citotóxico. Muitas teorias buscam explicar os mecanismos pelos quais o cobre é considerado pró-oxidante no metabolismo. Sua toxicidade pode ser causada pela capacidade de catalisar as reações que levam à formação de EROs em peixes (ROMÉO; GNASSIA-BARELLI, 1997; ROMÉO et al., 2000; LOPES et al., 2001). O cobre pode ser reduzido de  $Cu^{2+}$  a  $Cu^+$  via reação de Haber-Weiss ( $A + B$ ) (STOREY, 1996), catalisando a formação de  $\bullet OH$ , o mais potente radical oxidante capaz de ligar-se a praticamente todas as moléculas biológicas (BUERTTNER, 1993). Além disso, quando em altas concentrações, o cobre também colabora com a formação de  $\bullet OH$  a partir de hidro e lipoperóxidos (B) já formados por outros processos fisiológicos, aumentando a peroxidação das membranas celulares (BAKER et al., 1998).



A exposição a elevadas concentrações de cobre é danosa. Sua toxicidade crônica afeta inicialmente o fígado, pois este é o primeiro local de deposição após entrar na corrente sanguínea. Uma das consequências mais conhecidas do excesso de cobre é o dano peroxidativo de membranas lipídicas (CHOW, 1979), o que pode gerar alterações nos parâmetros sanguíneos, como hematócrito e concentração de hemoglobina (GATLIN; WILSON, 1986). Os mecanismos de DAs são conhecidos por serem capazes de inativar esta cadeia de peroxidação, evitando a formação do  $\bullet\text{OH}$ .

Por ser parte integrante da importante enzima antioxidante cobre-zinco superóxido dismutase (Cu, Zn-SOD), a restrição de cobre pode diminuir a função catalítica desta enzima em vários tecidos, tornando sua atividade um marcador do status de cobre nos diferentes tecidos. O cobre apresenta, portanto, importante papel na prevenção de danos oxidativos (LINDER, 2001). Por outro lado, sua carência resulta na redução das atividades da GSH-Px e da CAT (MCDERMOTT et al., 1994).

Outras teorias propõem que o cobre liga-se a proteínas inibindo inúmeras enzimas essenciais. Na presença do  $\text{O}_2$ , a ligação metal-proteína pode ser oxidada irreversivelmente, inativando a enzima (NAKAMURA; YAMAZAKI, 1972). As diversas teorias explicativas para a atuação do cobre no metabolismo oxidativo indicam que há, em muitos casos, sinergismo entre estes mecanismos, podendo, participar tanto na formação dos EROs quanto atuar nos mecanismos protéicos, estimulando ou mesmo inibindo enzimas. Rowley e Halliwell (1983) descreveram que, *in vitro*, a adição de sais de  $\text{Cu}^+$  a um sistema gerou altas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , levando à formação de radicais  $\bullet\text{OH}$ , mas que esta reação foi prevenida pela adição de concentrações fisiológicas de histidina e albumina. Estes autores concluíram que, as altas concentrações de proteínas no sangue ligam-se ao cobre indisponibilizando-o para catalisar a formação de radicais livres de  $\bullet\text{OH}$ .

Em peixes existem relatos de que o cobre pode tanto estimular quanto inibir as enzimas antioxidantes, dependendo da dose, da espécie e/ou da via de exposição. Após exposição do “stickleback”,

*Gasterosteus aculeatus aculeatus*, às concentrações de cobre de 0, 25, 100 e 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , Sanchez et al. (2005) observaram rápido aumento nas concentrações das enzimas SOD, CAT e GSH-Px e diminuição das concentrações de GSH. A exposição ao cobre, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias no bass europeu, *Dicentrarchus labrax* (GWOZDINSKI et al., 1992) e aumentou a atividade da CAT no fígado e rim de carpa comum (DAUTREMEPUITS et al., 2004). Paulistinhas ("zebrafish", *Danio rerio*) expostos a 40 e 140  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ , por duas semanas, mostraram inibição nas atividades da CAT e GST (PARIS-PALACIOS et al., 2000). Da mesma forma, em carpa comum, CAT e GST foram inibidas após 96 h de exposição ao cobre nas concentrações de 100 e 250  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (DAUTREMEPUITS et al., 2002). Utilizando injeção intraperitonial de cobre, houve inibição da SOD em carpas após 48 h (VARANKA et al., 2001), enquanto esta enzima foi rapidamente induzida em dourada, *Sparus aurata* (PEDRAJAS et al., 1995).

Muitas das pesquisas de EO em peixes objetivam os aspectos toxicológicos, assim como, os efeitos de diferentes xenobióticos na atividade das enzimas antioxidantes e na intensidade da peroxidação lipídica (DI GIULIO et al., 1989; BAINY et al., 1996; ZIKIC et al., 1996; HAI et al., 1997). Estes parâmetros foram propostos como biomarcadores para contaminantes. Entretanto, revisando os estudos disponíveis, há tendência clara, em muitos casos, de que as respostas estejam relacionadas à espécie, tecido, parâmetro antioxidante e/ou dose-resposta (MARTINÉZ-ALVAREZ et al., 2005). Estudos relacionados ao estresse oxidativo em peixes abrem novas linhas de pesquisa, gerando maiores conhecimentos na fisiologia e toxicologia de peixes. Novos estudos poderão agregar informações mais precisas a respeito das respostas das defesas antioxidantes nas diferentes espécies de peixes sob variadas circunstâncias, assim como, a respeito dos mecanismos regulatórios destas respostas, trazendo benefícios relacionados à piscicultura e à aquicultura (MARTINÉZ-ALVAREZ et al., 2005).

Normalmente, a avaliação do metabolismo oxidativo é realizada no fígado de peixes (FITZGERALD, 1992). Na musculatura dos peixes, a

avaliação do status oxidativo também tem importância, principalmente, pelo alto metabolismo oxidativo e produção de EROs no músculo vermelho (ASKNES; NJAA, 1981; WILHELM FILHO et al., 1993) e pela influência direta do metabolismo oxidativo e da oxidação lipídica na qualidade do filé dos peixes a serem consumidos (SANT ´ANA; MANCINI-FILHO, 2000).

### **1.3.2. Intermediários metabólicos**

A alteração nas concentrações dos intermediários metabólicos plasmáticos ou teciduais vem sendo empregada em estudos de efeitos de poluentes. Tais parâmetros permitem desenhar os ajustes no metabolismo energético de carboidratos durante o período de exposição a condições adversas (HEATH, 1995). A estimulação do metabolismo pode ser claramente refletida nas mudanças no consumo de oxigênio durante a exposição ao cobre (MCGEER al., 2000) ou pelo aumento de excretas metabólicos (ex: amônia; TAYLOR et al., 1996). Uma das principais fontes de energia utilizada pelos peixes são os carboidratos e sua taxa de utilização depende diretamente da demanda energética do indivíduo (SOENGAS; MOON, 1995). Muitos peixes quando submetidos a situações de estresse realizam ajustes metabólicos que incluem a redução do metabolismo basal e a utilização de processos como a glicogenólise, que converte o glicogênio armazenado no fígado em glicose (HOCHACKA; SOMERO, 1984). Os níveis de glicose sanguíneos são frequentemente citados como indicador fisiológico sensível ao estresse em peixes (WEDEMEYER; MCLEAY, 1981). Segundo Wendell Bonga (1997) e Van Weerd e Komen (1998), o aumento de glicose no plasma, após exposição ao estresse assegura o abastecimento e redistribuição de energia para defender o equilíbrio homeostático.

A hipersecreção de adrenalina e de cortisol são consideradas as primeiras respostas ao estresse. Estas respostas nos peixes podem ser ativadas em decorrência da exposição a metais pesados (PRATAP; WENDELAAR BONGA, 1990), alavancando um amplo conjunto de alterações bioquímicas e fisiológicas chamados de estresse secundário. Os efeitos metabólicos incluem hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio, catabolismo da proteína muscular e alteração

dos níveis de proteína no sangue, colesterol e ácidos graxos livres (WENDELAAR BONGA et al., 1990; JOBLING, 1994). O cortisol afeta o metabolismo de carboidratos, assim aumentos nos níveis de cortisol são frequentemente seguidos de hiperglicemia em peixes (WENDELAAR BONGA, 1977). Os níveis plasmáticos de glicose têm mostrado correlação com os níveis de cobre na brânquia, até mesmo em longas exposições, e deste modo tem sido sugerido como indicador de estresse (LAURÉN; MCDONALD, 1985). A exposição ao cobre interfere no processo de captação de oxigênio por causar alterações histopatológicas nas brânquias. Segundo Mazon et al. (2002b), o aumento da glicose plasmática pode ocorrer de maneira mais severa refletindo a ação do cobre no processo de troca gasosa decorrente das alterações na estrutura branquial. Para suprir a demanda energética na destoxificação e reparação dos processos de exposição ao cobre, o glicogênio e/ou a glicose são mobilizados no fígado. Carvalho (2003) afirma que o cobre em excesso altera o metabolismo celular, requerendo energia para destoxificação.

Hiperglicemia é uma resposta comum a estressores em peixes de água doce e tem sido considerada como indicador de exposição sub-letal a poluentes. Monteiro et al. (2005) avaliaram os efeitos da exposição ao cobre nas concentrações de 40 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, por 3, 7, 14 e 21 dias. Observaram aumento na concentração de glicose plasmática com a elevação de cobre aquático, porém, não houve linearidade em relação às concentrações e ocorreu interação positiva entre tempo de exposição e cobre na glicose plasmática. Pelgrom et al. (1995) observaram aumento da glicose plasmática em tilápia mossâmbica, *Oreochromis mossambicus*, exposta ao cobre (200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Tavares-Dias et al. (2002) observaram hiperglicemia em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, após exposição a duas doses de 1  $\text{mg.L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$ .

Em situações estressantes, como em ambientes com concentração de oxigênio reduzida, determinados peixes podem produzir lactato (HOCHACKA; SOMERO, 1984). As concentrações de lactato

plasmático são indicativas de ativação de metabolismo anaeróbico. A exposição ao cobre não promoveu alterações nas concentrações de lactato plasmático de bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (GRIFFIN et al., 1999). Dethloff et al. (1999) expuseram truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, ao cobre na concentração de  $16 \mu\text{g.L}^{-1}$  e não verificaram alterações de glicose e lactato plasmáticos. Outros autores pesquisando os efeitos de concentrações sub-letais do cobre que variaram de  $9,5$  a  $27 \mu\text{g.L}^{-1}$  também não verificaram alterações do metabolismo glicolítico (MCKIM et al., 1970; CHRISTENSEN et al., 1972). Alterações significativas foram verificadas em concentrações de cobre iguais ou acima de  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  (MCKIM et al., 1970; CHRISTENSEN et al., 1972; CYRIAC et al., 1989; SHAH et al., 1995).

Peixes cronicamente expostos a contaminantes químicos podem apresentar hipoglicemia, provavelmente devido à combinação de alguns efeitos como depleção do glicogênio hepático, redução da alimentação e até perda de glicose na urina (HEATH, 1995). Por exemplo, Haux et al. (1981) observaram que trutas arco-íris expostas ao chumbo, durante 16 semanas, apresentaram redução da glicemia. Winkaler et al. (2001) avaliaram a glicemia de lambaris, *Astyanax* sp., coletados em diferentes ambientes. Estes autores verificaram que os peixes provenientes dos locais potencialmente mais contaminados apresentaram redução da glicemia, podendo representar estresse crônico. A inibição da atividade da piruvatoquinase pelo cobre e zinco foi descrita em robalo, *Dicentrarchus labrax*, e os efeitos destes metais têm relação com a competição direta com cátions bivalentes pelos sítios de ligação da proteína induzindo variações na conformação da enzima (ISANI et al., 1994).

Evidências nas alterações da atividade das enzimas, chave da via glicolítica no fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa*, mantido em pH baixo ou alto, com ou sem adição de cobre, demonstram o efeito do ambiente nas respostas metabólicas adaptativas (CARVALHO; FERNANDES, 2008). Estes autores observaram alterações no metabolismo dos peixes exigindo alta energia para sobreviver aos

efeitos da temperatura, pH e cobre. Takasusuki et al. (2004) expuseram curimatás a concentrações de cobre de  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$  em pH 4,0 e de  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$  em pH 8,0, por 96 h. Observaram aumento na glicose plasmática dos animais expostos ao cobre e pH (alto e baixo) em relação às exposições isoladas destes fatores, refletindo aumento na demanda energética para manter a homeostase. Observaram, ainda, aumento nas concentrações plasmáticas de lactato dos peixes expostos por 24 h ao cobre em pH 4,5; indicando o uso de glicólise anaeróbica neste tecido para suprir os requerimentos energéticos.

A exposição ao cobre e baixo pH, isolados e associados, causou aumento da amônia plasmática (WILSON; TAYLOR, 1993; BEAUMONT et al., 1995b; DAY; BUTLER, 1996). Beaumont et al. (2000) encontraram correlação negativa entre a velocidade de natação e a concentração de amônia plasmática, sugerindo que a amônia pode afetar a performance natatória por sua função reguladora de certas vias metabólicas ou por efeitos na função neuromuscular (BEAUMONT et al., 1995b). Aumentos na concentração de amônia plasmática foram observados por outros autores na associação de exposição a cobre e pH ácido como em truta marrom, *Salmo trutta* (BEAUMONT et al., 1995a; 2000; DAY; BUTLER, 1996) e truta arco-íris (WILSON; TAYLOR, 1993).

A  $\text{PcO}_2$  é a tensão de  $\text{O}_2$  abaixo da qual o peixe não é capaz de suprir a demanda de  $\text{O}_2$  necessária à manutenção de seu metabolismo aeróbico. Desta forma, o animal passa a utilizar mecanismos como o metabolismo anaeróbico para suprir a demanda energética (SANTOS, 2006). Hochachka e Somero (1973; 1984) propuseram que organismos ectotérmicos, particularmente os peixes, utilizam estratégias bioquímicas para manter a homeostase metabólica durante oscilações de OD, de temperatura e de outros parâmetros químicos da água. Diminuições do OD são normalmente encontradas em águas tropicais (ALMEIDA-VAL et al., 1993). Animais que vivem nestas condições apresentam diferentes estratégias para sobreviver e se adaptar a ela. Dentre elas as respostas bioquímicas contribuem para que os peixes

possam enfrentar baixos níveis de OD, tamponando seus efeitos (MORAES et al., 2002).

Em condição de hipóxia severa, a quantidade de oxigênio liberada para os tecidos é menor do que a necessária para a manutenção do metabolismo aeróbico. Como consequência, ocorre uma reorganização metabólica seguida de uma das vias: aumento da taxa de produção anaeróbica de ATP ou diminuição da taxa de ATP (depressão metabólica) (DUNN; HOCHACHKA, 1986). Estes mecanismos envolvem ativação glicolítica tendo como substrato a glicose e/ou o glicogênio e lactato como produto intermediário (PANEPUCCI et al., 2001). Independentemente da resposta bioquímica, as estratégias comportamentais ou fisiológicas decorrentes da exposição à hipóxia são observadas em muitas espécies de peixes, para preservar a deficiência energética celular (MORAES et al., 2002).

Tem sido sustentado que a supressão metabólica é elemento chave da tolerância à hipóxia em uma variedade de organismos, incluindo os peixes (HOCHACHKA; SOMERO, 1984). Esta diminuição no metabolismo aeróbico, juntamente com a ativação do metabolismo anaeróbico, possibilita a algumas espécies de peixes sobreviverem por longos períodos hipóxicos. Estes ajustes podem ocorrer simultaneamente com outros mecanismos, melhorando a transferência de oxigênio (VAL, 1996). Muitos animais expostos à hipóxia e anóxia por longos períodos podem inibir a ativação glicolítica para prevenir acidificação metabólica (SIDELL, 1983), pois a diminuição do pH pode prejudicar processos fisiológicos e causar danos severos às células (VAN DEN TILLARD; VAN WAARDE, 1985; WOOD, 1991).

De acordo com Vijayan et al. (1997), em tilápia mossambica submetida a estresse, o cortisol contribui direta ou indiretamente na produção de glicose, proveniente, provavelmente, da gliconeogênese dos substratos, incluindo lactato e aminoácidos. O lactato é o produto final da glicólise em condições de hipóxia e aumenta por processos fermentativos nos tecidos (CRESTANI et al., 2006). A fermentação da glicose, gerando lactato, foi descrita por Dunn e Hochachka (1986). De acordo com Begum e Vijayaraghavan (1999) aumento no conteúdo de lactato indica



desordens metabólicas e pode sugerir estresse respiratório severo nos tecidos de peixes.

Almeida-Val et al. (1993) mostraram que o tambaqui, *Colossoma macropomum*, começa a utilizar o metabolismo anaeróbico quando a redução da depressão metabólica não foi mais suficiente ou quando a concentração de  $O_2$  na água alcançou níveis reduzidos (hipóxia severa), aumentando a produção de lactato. Affonso et al. (2002) encontraram, em tambaqui exposto à hipóxia, acúmulo de lactato plasmático, demonstrando dependência do metabolismo anaeróbico. A fermentação glicolítica parece ser uma adaptação comum do tambaqui a condições de estresse (DUNCAN, 1998). Portanto, a utilização do metabolismo anaeróbico pode ser importante para a sobrevivência de peixes em condições adversas.

Moraes et al. (2002) expuseram a tuvira, *Gymnotus carapo*, à hipóxia ambiental e observaram aumento de duas vezes no lactato plasmático. Virani e Rees (2000) expuseram o “gulf killifish”, *Fundulus grandis*, à hipóxia e verificaram aumento de 20 vezes no lactato plasmático, indicando aumento no metabolismo anaeróbico. Moraes et al. (1997a) avaliaram os efeitos da exposição do cascudo, *Hypostomus regani*, à hipóxia extrema (8 mg.L<sup>-1</sup> OD). Após quatro horas de exposição houve aumento do lactato plasmático, indicando ampla mobilização de intermediários e alta atividade fermentativa. Espécies como o douradinho, *Carassius auratus*, (SHOUBRIDGE; HOCHACHKA, 1981) e a carpa, *Cyprinus carpio* (HOCHACHKA, 1961) desenvolveram notável capacidade de anaerobiose sob hipóxia severa. Santos (2006) observou níveis constantes de lactato plasmático em decorrência da exposição do matrinxã, *Brycon cephalus*, à hipóxia, demonstrando que estes valores não se alteraram em decorrência da diminuição metabólica pois foi observada baixa atividade natatória.

As proteínas representam grande fonte energética para os teleósteos (WEBER; ZWINGESLSTEIN, 1995). A redução hepática de proteína em bagre do canal exposto ao clomazone (isoxazolidinonas), herbicida utilizado na agricultura, indica aclimação fisiológica dos peixes

para superar a situação de estresse utilizando o catabolismo de proteína para suprir a demanda de energia (CRESTANI et al., 2006). Santos (2006) avaliou a exposição do matrinxã à hipóxia e observou um aumento de amônia plasmática, possivelmente decorrente da mobilização de aminoácidos para a síntese de glicose e glicogênio em outros tecidos (WALSH; HENRY, 1991; MORAES et al., 1996; 2002). Moraes et al. (2002) sugeriram que a concentração elevada de amônia plasmática acompanhada de aminoácidos livres em tuviras expostas à hipóxia, indica nova síntese de glicose pois, o aumento de amônia foi acompanhado de piruvato e glicose.

Moraes et al. (1997b) avaliaram os efeitos da exposição à hipóxia severa ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1} \text{ OD}$ ), por seis horas, em pacu. Foi observado um aumento da glicose plasmática nas primeiras horas de exposição decaindo posteriormente. Os níveis de lactato plasmático aumentaram no início da exposição, voltando para os níveis-controle após seis horas. Não houve variação na concentração de piruvato plasmático. A relação lactato/piruvato revelou mudanças metabólicas significativas no plasma, caracterizando este tecido como via importante para tamponar o sistema.

Panepucci et al. (2001) avaliaram os efeitos da exposição à hipóxia em pacu, por dois, quatro e seis horas. Estes autores observaram um aumento no lactato plasmático após quatro horas, diminuindo após seis horas, o que demonstra ativação do metabolismo anaeróbico. A diminuição, após 6 h, pode ter-se dado em função da respiração na superfície aquática (ASR), mecanismo utilizado por esta espécie durante períodos de hipóxia severa, para a utilização da camada mais oxigenada da interface ar-água e ventilar suas brânquias (RANTIN; KALININ, 1996; RANTIN et al., 1998).

Modificações no pH do sangue afetam o pH intracelular que, por sua vez, pode alterar profundamente o metabolismo, uma vez que a conformação de proteínas e a atividade enzimática são influenciadas por mudanças no pH (DEVLIN, 1997). A manutenção do pH interno e a regulação iônica são normalmente problemas para peixes em pHs baixo

e alto, visto que muitos processos metabólicos necessitam de pH ideal para sua performance (YESAKI; IWAMA, 1992).

Pelgrom et al. (1995) verificaram uma diminuição no pH sanguíneo de tilápia mossambica exposta a concentração de cobre de  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ , caracterizando distúrbio da regulação ácido-base. Muitos animais expostos à hipóxia por longos períodos podem inibir a via glicolítica para prevenir acidose metabólica (SIDEELL, 1983) pois, a diminuição do pH do sangue pode prejudicar processos fisiológicos e causar danos severos às células (WOOD, 1991). Affonso et al. (2002) verificaram que a exposição à hipóxia causou diminuição significativa do pH sanguíneo em tambaqui.

### 1.3.3. Metalotioninas

As metalotioninas (MTs) são proteínas não enzimáticas, de baixo peso molecular e alta concentração de cisteínas. Os grupos tiol (-SH) dos resíduos de cisteína permitem às MTs se ligarem a metais da família I B e II B da Tabela periódica (KÄGLI; NORDBERG, 1979). Devido a esta capacidade de ligação com metais essenciais, como o Cu e o Zn, as MTs são citadas no controle homeostático da disponibilidade destes metais nos sistemas biológicos (HAMER, 1986), caracterizando-as por agir como reserva disponível para satisfazer demandas enzimáticas e metabólicas destes metais (BROUWER et al., 1989; VIARENGO; NOTT, 1993; ROESIJADI, 1996). Diversos autores acreditam que a indução das MTs contribui para aumentar a tolerância à exposição de metais (ROESIJADI et al., 1982; GEROGÉ; OLOSSON, 1994; PAVICIC et al., 1994; SCHLENK et al., 1999; CAJARAVILLE et al., 2000; LINDE et al., 2001). Desde a descoberta e caracterização de MTs por Margoshes e Vallee (1957), houve propostas de implicação destas proteínas nos processos de destoxificação por metais pesados, por não exercerem sua ação tóxica quando ligados a elas. Ferreira et al. (2008) apontaram que os efeitos antagônicos encontrados após a exposição a concentrações de cádmio e carbendazim se devem à redução na toxicidade do cádmio causada pela indução na concentração da MT. A MT é induzida por metais pesados (SATO et al., 1996) e também por diferentes químicos e estressores e particularmente por pró-oxidantes (VIARENGO et al., 1999).

A indução da síntese de MT já foi descrita em diversos grupos animais (anelídeos, moluscos, crustáceos e peixes) em resposta à contaminação por metais como a Ag, Cd, Cu e Hg, sugerindo o uso potencial da concentração de MT como biomarcador (AMIARD et al., 2006). A MT é parte do conjunto de biomarcadores reconhecidos no continente europeu, sendo avaliada em programas de monitoramento ambiental (BEQUALM) (MATHIESSEN, 2000). É parte também dos biomarcadores selecionados para monitorar ambientes marinhos no plano de ações da Organização das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME, 1999).

Por possuir características altamente conservativas e por ser praticamente onipresente, as MTs possuem papel essencial nos processos vitais (AMIARD et al., 2006). Mason e Jenkins (1995) propuseram duas funções para as MTs. Primeiramente, estas proteínas constituem reservas não tóxicas disponíveis para a síntese de metaloenzimas (BROUWER et al., 1989; VIARENGO; NOTT, 1993; ROESIJADI, 1996). Segundo Roesijadi et al. (1992), as MTs podem reduzir a ligação de metais nos sítios de ligação, diminuindo assim seu potencial tóxico. As MTs parecem ter outras funções importantes, incluindo a proteção contra radiação ionizante (Cai et al., 1999) e prevenção do estresse oxidativo (CAVALETTO et al., 2002; CORREIA et al., 2002). Organismos pré-expostos a metais, como o Cd, resistiram ao estresse oxidativo aumentando a concentração de MTs parecendo limitar os efeitos do  $\bullet\text{OH}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  por reagirem com eles. A atuação das MTs como parte do sistema de defesas antioxidantes ainda está em discussão. Amiard et al. (2006) fizeram uma revisão dos conceitos atuais do papel da MT em organismos invertebrados e sua utilização como biomarcadores. Parece que a ligação do cobre com o grupamento sulfridrila da MT é uma das mais estáveis dentre os demais metais, resistindo à degradação e diminuindo a disponibilidade destes ao se ligarem à MT (BREMNER, 1991; AMIARD et al., 2006). Assim, as formas de atuação como antioxidante pode ser por indisponibilizar o cobre para gerar EROs ou pela própria ação redox dos resíduos de cisteína (ENGLISH; STOREY, 2003).

Compostos oxidantes promovem a ativação de genes para a metalotionina (MT), o que implica no envolvimento das MTs nos sistemas de defesa antioxidante celular (ENGLISH; STOREY, 2003). Porém, alguns autores afirmam que os resultados de pesquisas sobre as propriedades antioxidantes das MTs ainda são contraditórios. As funções biológicas das MTs envolvem a destoxificação de metais e sua homeostase; por isso a MT é uma proteína importante para o metabolismo intracelular do cobre, na proteção contra danos oxidativos e toxicidade resultante da exposição excessiva a estes metais (MUTO et al., 1999). A MT apresenta ainda importante papel como sequestradora de espécies de radicais livres, protegendo estruturas celulares contra o estresse oxidativo (SATO; BREMNER, 1993). Por outro lado, Fabisiak et al. (1999) demonstraram que as ligações cobre-MT são sensíveis à oxidação pelo  $H_2O_2$  e que a oxidação parece diminuir a habilidade da MT em sequestrar cobre. Desta forma, a liberação do cobre pode potencializar os danos celulares em situação de EO, demonstrando que os mecanismos fisiológicos podem potencialmente controlar a ligação e/ou liberação do cobre destas proteínas chave. A habilidade da MT em se ligar com o cobre e suprimir o cobre mediador de oxidações foi ótima em ambientes redutores e corresponde à capacidade máxima da MT em se ligar ao cobre (12 mol de Cu/1mol de MT). Em contraste, só uma fração destes sítios de ligação e desta capacidade de supressão foi observada quando a interação MT-Cu ocorreu em ambientes oxidados. Assim a proteção da MT por meio da ligação com o cobre é fortemente abalada na presença de  $H_2O_2$ , disponibilizando o cobre para eventuais reações redox.

Foi constatado que aumentos na concentração de MT podem estar associados à diminuição da sensibilidade de um organismo ao excesso de metais (ROESIJADI; FELLINGHAM, 1987; STUHLBACHER et al., 1992; PAVICIC et al., 1994). A indução da MT em peixes é influenciada por fatores naturais como: diferenças inter-específicas, idade, sexo, maturidade sexual, etc. (DUQUESNE, 1992). Alguns fatores não relacionados com a contaminação de metais também podem induzir à síntese de MTs, gerando falsas conclusões no uso deste biomarcador.

Fatores como temperatura (SERAFIM et al., 2002), pH (CARVALHO et al., 2004), salinidade (LEUNG et al., 2002), tamanho do organismo (LEUNG; FURNESS, 2001), estresse físico por captura, despesca e transporte, salinidade e estágio reprodutivo (BAER; THOMAS, 1990), variações na concentração de OD e congelamento (ENGLISH; STOREY, 2003), presença de antibióticos ou herbicidas (MOSLEH et al., 2004) são os mecanismos descritos na literatura por estimularem aumentos na concentração de MTs nos peixes. Entretanto, o nível de indução nestas condições é normalmente menor que o causado por metais (KÄGI, 1993). Este fator é importante, pois, a relevância do uso da MT como biomarcador depende das condições naturais do ambiente e não somente da concentração do metal no meio de exposição (AMIARD et al., 2006). English e Storey (2003) afirmam que as funções das MTs variam de forma espécie-específica e estresse-específica.

A MT tem sido identificada em vários órgãos de peixes expostos a metais (OLSVIK et al., 2000; BRAGIGAND; BERTHET, 2003) sendo o fígado o órgão no qual tem sido encontrada em concentrações mais altas (OLSVIK et al., 2000). Os tecidos normalmente envolvidos com a absorção, estoque e excreção de metais, têm alta capacidade de sintetizar MTs. Nos organismos aquáticos estas proteínas foram identificadas nas glândulas digestórias (VIARENGO et al., 1984) e brânquias (VIARENGO et al., 1980; ROESIJADI; KLERKS, 1989; MOUNEYRAC et al., 1998). As brânquias dos peixes são órgãos multifuncionais onde ocorrem os transportes de íons, trocas gasosas, regulação ácido-base e excreções (WENDELAAR BONGA et al., 1990). É o primeiro local de ação tóxica de exposição ao cobre onde ocorrerá acúmulo deste metal em peixes podendo, eventualmente, levar a danos e disfunções ao órgão (MALLATT, 1985; PELGROM et al., 1995). Os danos branquiais podem ser prevenidos ou contrabalançados pelo aumento na síntese de MTs (DANG et al., 1999).

#### **1.3.4. Enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase**

Nos peixes teleósteos, os mecanismos de regulação ácido-base são aperfeiçoados pela dinâmica modulação das proteínas transportadoras de íons nas brânquias e rins (HEISLER, 1989; CLAIRBONE et al.,

2008). As brânquias dos peixes de água doce possuem mecanismos para o transporte ativo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  (EDDY, 1985). Estes mecanismos são afetados pela ação de metais, destacando-se como marcadores de mecanismos de intoxicação (MCDONALD et al., 1989). Efeitos potenciais dos metais na fisiologia dos peixes podem estar associados a: 1. interrupção de um ou mais mecanismos de transporte, ampliando ou bloqueando as vias de difusão; 2. interferindo nos sítios de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  na superfície, com concomitante efeito na estabilidade da membrana (MCDONALD et al., 1989). As células cloreto, células de transporte de íons do tecido branquial dos peixes teleósteos, que atuam no equilíbrio osmótico e hidroeletrolítico, são ricas em mitocôndria e extensos sistemas de membranas tubulares, contendo grande quantidade de enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Esta enzima pertence ao grupo das ATPases e utiliza energia para o transporte iônico, mantendo o gradiente celular de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Sua atividade possui papel crucial no transporte de íons no epitélio branquial (MCCORMICK, 1995; FLIK et al., 1996).

Existem relatos que evidenciam os efeitos de metais no mecanismo de osmorregulação. Em truta arco-íris, o cobre induziu distúrbios osmorregulatórios pela diminuição da captação ativa de íons, devido à inibição direta da atividade de enzimas específicas para o transporte iônico, tal como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (LI et al., 1998; DEBOECK et al., 2000). Lorz e McPherson (1976) observaram inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial em salmão "coho", *Oncorhynchus kisutch*, expostos a concentrações de cobre de 5 a 30 ppb. Ay et al. (1999) expuseram a tilápia "redbelly", *Tilapia zillii*, a concentrações de 0,5; 1,2 e 4,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  (14 dias) e encontraram correlação negativa ( $r = -0.756$ ) entre os níveis de cobre aquático e a atividade branquial da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Dang (2000) observou que a tilápia mossâmbica exposta por quatro semanas à água ácida ou cobre aquático aumentou a densidade de células cloreto mas diminuiu a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial. Wendelaar Bonga et al. (1990) e Li et al. (1998) caracterizaram previamente esta alteração afirmando que o aumento de células cloreto em condições de estresse ocorre com

liberação de células imaturas com baixas concentrações da enzima. O cobre diretamente induz necrose e indiretamente, via cortisol, induz apoptose das células cloreto na brânquia de tilápias (LI et al., 1998). Dang (2000) descreveu que na tilápia mossâmbica houve aumento no número de células cloreto necróticas e apoptóticas e que estas continham menores concentrações de  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ .

McGeer et al. (2000) observaram que a truta arco-íris, quando exposta cronicamente ao cobre (2 meses –  $75 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), apresentou aumento de 2,5 vezes na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  branquial e caracterizou esta resposta como tentativa de restabelecer o transporte iônico branquial perdido durante a longa exposição ao metal. Monteiro et al. (2005) observaram que o acúmulo de cobre nas brânquias inibiu a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  branquial em tilápia do Nilo exposta às concentrações de cobre de 0,04 e 0,40  $\text{mg.L}^{-1}$ . Esta inibição ocorreu com três dias de exposição e permaneceu até 21 dias, confirmando a ausência de processo compensatório no tecido branquial. Houve diferença entre a exposição aos níveis de cobre avaliados, com valor menor para o grupo exposto à concentração de 0,4  $\text{mg.L}^{-1}$ . Pelgrom et al. (1995) expuseram a tilápia mossâmbica a concentrações de cobre de 0,05; 0,10 e 0,20  $\text{mg.L}^{-1}$ , por seis dias, resultando em aumento significativo da concentração de cobre nas brânquias e no plasma de forma mais proeminente nos peixes expostos a 0,20  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Pesquisas demonstraram que “fathead minnows”, *Pimephales promelas*, diminuiu a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  em resposta à exposição ao cobre (0,15  $\text{mg.L}^{-1}$ ) em 24 horas de exposição (Kolok et al., 2002). Entretanto, esta resposta pode ter resultado de danos causados nas brânquias e em algumas espécies pode ser reflexo dos mecanismos de defesa que resultariam na diminuição da taxa metabólica em um período de 24 h. DeBoeck et al. (2007) relataram diminuição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  em carpa comum e carpa “gibel”, *Carassius auratus gibelio*, em poucas horas de exposição a níveis sub-letais de cobre. Por não terem sido observados danos branquiais nestes peixes, os autores sugerem que esta diminuição pode permitir ao peixe sobreviver à fase



de “choque inicial” de exposição ao cobre, através da redução do fluxo de água e da absorção branquial de cobre. Neste cenário, a redução da taxa metabólica pode ser resultado tanto da redução de necessidade energética (diminuindo a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) como da redução da absorção de oxigênio. Pistole et al. (2008) descreveram que aumentos no metabolismo decorrentes da exposição ao cobre por períodos maiores (96 h) ocorreram também nesta fase “choque inicial”, sugerindo que este incremento no metabolismo é decorrente de respostas celulares e mecanismos de compensação resultantes do início da exposição. Estes mecanismos incluem a produção de MTs (KIL et al., 2006; WU et al., 2006), assim como, aumentos compensatórios na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (LEENA; OOMMEN, 2000; DEBOECK et al., 2007).

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase em mamíferos diminuiu consideravelmente em condições de hipóxia em estudos de Thevenod e Friedmann (1999) e Comellas et al. (2007). Comellas et al. (2007) avaliaram que a possível relação entre exposição à hipóxia e inibição desta enzima está correlacionada a um mecanismo sinalizador onde os EROs gerados no EO agem modulando ajustes metabólicos do consumo energético, diminuindo a produção de ATP. Este mesmo autor relata ainda haver relação entre os níveis de GHS-Px e SOD na prevenção da inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, sugerindo que a exposição celular a concentrações destas enzimas foram efetivas em prevenir os danos decorrentes da exposição à hipóxia na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Por outro lado, Bogdanova et al. (2003a; 2003b) avaliaram hepatócitos de truta arco-íris e eritrócitos de camundongos e afirmam que a inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase não é decorrente da diminuição nos níveis celulares de ATP.

### 1.3.5. Parâmetros Hematológicos

A qualidade da água é considerada importante fator responsável por variações na hematologia, resultado da íntima associação entre o sistema circulatório e o ambiente externo (CASSILAS; SMITH, 1977). Nas últimas décadas, as variáveis hematológicas vêm sendo aplicadas no diagnóstico clínico de peixes, auxiliando a avaliação dos efeitos de xenobióticos e substâncias tóxicas (WENDELAAR BONGA, 1997). Assim, a hematologia pode ser considerada como parâmetro

essencial para o estado geral da saúde em diversas espécies de peixe (NUSSEY et al., 1995). Pesquisadores relatam o uso de parâmetros hematológicos como indicador de estresse (CASSILAS; SMITH, 1977; TOMASSO et al., 1983) e de exposição a substâncias tóxicas (VAN VUREN, 1986) como metais (CHRISTENSEN et al., 1972; CRYIAC et al., 1989; VAN DER MERWE, 1992; WEPNER et al., 1992).

Autores descrevem hipersecreção de muco nas brânquias de peixes expostos a metais. Este sistema de defesa busca diminuir a quelação e difusão dos metais do meio externo para a corrente sanguínea mas, por outro lado, pode dificultar ou impedir as trocas gasosas levando o organismo a uma hipóxia tecidual (LICHTENFELS et al., 1996). Para Nussey et al. (1995), durante a exposição ao cobre o peixe parece desenvolver déficit na captação de oxigênio, gerando situação semelhante à da hipóxia ambiental. Além da secreção de muco, a exposição ao cobre pode causar danos morfológicos (Mazon et al., 2002a) e espessamento do epitélio branquial, incluindo proliferação celular e hipertrofia (MALLATT, 1985; DANG, 2000). Estas alterações reduzem consideravelmente a eficiência da superfície respiratória como trocadora de gases. Mudanças na morfologia branquial em decorrência da exposição a metais pode ser uma resposta compensatória para dificultar a entrada dos metais nas células deste tecido (MALLATT, 1985; DANG, 2000). Como consequência, os parâmetros sanguíneos são alterados de forma a otimizar o transporte de oxigênio no sangue e sua liberação nos tecidos (HEATH, 1995).

Dentre os efeitos biológicos do cobre, as mudanças hematológicas são evidentes, variando, em muitos estudos, o número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito. Algumas destas mudanças são transientes e outras acontecem por maiores períodos. As diferenças que ocorrem entre os experimentos podem muitas vezes ser devidas aos níveis de cobre estudados, espécie e qualidade da água, dificultando muitas vezes a compreensão destes valores e a comparação entre os estudos. Alguns autores caracterizam como resposta de exposição ao cobre a hemoconcentração, com aumento do hematócrito, hemoglobina

e eritrócito (NUSSEY et al., 1995; CERQUEIRA; FERNANDES, 2002; MENEZES, 2005). De acordo com O'Connor e Fromm (1975), os íons metálicos são conhecidos por estimular a eritropoiese.

Nussey et al. (1995) expuseram a tilápia mossâmbica a concentrações de cobre de 0,16 e 0,40 mg.L<sup>-1</sup> por 96 h e por quatro semanas. Foram observados aumentos nos eritrócitos e na hemoglobina na exposição a 0,16 mg.L<sup>-1</sup> por 96 h, sendo estas respostas atribuídas ao cobre por estimular a eritropoiese e por meio do aumento da hemoglobina elevar a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos (CYRIAC et al., 1989). Por outro lado, na exposição a 0,40 mg.L<sup>-1</sup>, por 96 h, houve diminuição de eritrócitos indicando inibição na produção de células vermelhas. A destruição destas células ocorre em consequência da hemólise dos eritrócitos decorrentes da debilidade dos mecanismos de osmorregulação e dos danos branquiais (WEDEMEYER; YASUTAKE, 1977; LARSSON et al., 1985). Estes achados também foram descritos por Strivastava e Narain (1985) em "stinging catfish" *Heteropneustes fossilis* submetidos ao estresse e por Van Der Merwe (1992) no bagre africano, *Clarias gariepinus*, após exposição ao cobre. O acúmulo de cobre nas brânquias, fígado e rins causou hemorragia interna resultando na diminuição dos eritrócitos (RAJ-BANSHI; GUPTA, 1986; VAN DER MERWE, 1992; NUSSEY, 1994).

Nussey et al. (1995) acreditam que, como resultado do aumento da respiração anaeróbica em decorrência da exposição ao cobre, os peixes aumentam a concentração de CO<sub>2</sub> no sangue, elevando a produção de ácido láctico como efeito tampão a esta elevação, diminuindo, portanto, o pH sanguíneo. Este aumento da acidez causa inchaço nas células vermelhas, gerando aumento do volume corpuscular médio (VCM) (SOIVIO et al., 1974). O VCM caracteriza o tamanho e condição dos eritrócitos, refletindo divisões celulares normais ou anormais durante a eritropoiese. Diminuições no VCM indicam que houve aumento de eritrócitos imaturos liberados dos tecidos eritropoiéticos (LARSSON et al., 1985). Aumentos deste parâmetro, por outro lado, indicam que os eritrócitos sofreram turgescência devido à hipoxemia

ou estresse osmótico como observado por Nussey et al. (1995) em tilápia mossâmbica em resposta à concentração de cobre de  $0,40 \text{ mg.L}^{-1}$  (96 h). Irregularidades no tamanho celular têm sido correlacionadas a hemodiluição, alterações peroxidativas da membrana e distúrbios osmorregulatórios causados por metais pesados (RONCERO et al., 1992).

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) é a taxa de concentração de hemoglobina (Hb) em relação ao hematócrito e não é influenciada pelo VCM ou pelo número de eritrócitos (Eri). No entanto, este parâmetro pode ser interpretado de maneira incorreta, quando há, por exemplo, a liberação na corrente sanguínea de células vermelhas imaturas, com menor VCM e diferente concentração de Hb (SOIVIO; NIKIMAA, 1981).

Tavares-Dias et al. (2002) avaliaram os efeitos do cobre em pacu, aplicando duas doses de  $\text{CuSO}_4$  nas concentrações de  $0,50$  e  $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$ , com intervalo de dois dias entre cada aplicação. No primeiro dia após a segunda aplicação, nas duas concentrações de cobre avaliadas, houve redução do número de eritrócitos, da taxa de hemoglobina e do CHCM e aumento do VCM. Houve diminuição de hemoglobina na exposição a  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$  e aumento na glicemia na exposição a  $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$ . A exposição a  $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$  causou diminuição do VCM após 15 dias de exposição. Singh e Reddy (1990) avaliaram que em bagre indiano, *Heteropneustes fossilis*, o tratamento com cobre provocou hiperglicemia, redução de Eri e Hb até 30 dias após o tratamento. Similarmente, Singh (1995) observou decréscimo de Eri, Hb, Htc e CHCM e aumento do VCM em “murrel” de água doce, *Channa punctatus*.

A exposição ao cobre e ao pH ácido causa alterações hematológicas em peixes (HEATH, 1995; WOOD, 1989; WANG et al., 1998; CERQUEIRA; FERNANDES, 2002). Muitas das mudanças nas células sanguíneas em baixo pH aquático são reflexos de distúrbios iônicos (MILLIGAN; WOOD, 1982; WOOD, 2001). O estresse ácido é responsável por uma grande variedade de respostas hematológicas em peixes de água doce (MCDONALD et al., 1989), bem como, a exposição ao cobre (NUSSEY

et al., 1995; HEATH, 1995). O decréscimo do pH da água causa acidose sanguínea, em razão do aumento da pressão arterial de  $\text{CO}_2$ . Esta acidose primeiramente diminui o oxigênio contido no sangue e, associado ao acréscimo nos níveis de catecolaminas circulantes, pode causar rápido aumento na taxa de ventilação branquial dos peixes. A elevação da hemoglobina, como também, do eritrócito, pode ser uma forma de compensar alguma deficiência que ocorra no processo de trocas gasosas no epitélio branquial. A elevação da concentração de Hb do tambaqui, observada por Menezes (2005) durante a exposição ao meio ácido, sugere um meio para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos.

Carvalho e Fernandes (2006) avaliaram a associação da exposição ao cobre, em pH 4,5 e pH 8,0; em temperatura 20 e 30°C, por 96 h no curimatá. Estes autores observaram interação entre cobre e pH somente em Hb e CHCM. As respostas hematológicas ao cobre em pH baixo e alto, a 20 e 30°C, indicaram distúrbios mais complexos que os decorrentes da exposição isolada ao meio ácido. Estes autores concluíram que as respostas à exposição ao cobre em diferentes pHs e temperaturas têm mostrado que a magnitude das respostas hematológicas parece depender das concentrações de cobre na água e a sensibilidade da espécie ao metal.

Barcarolli e Martinez (2004) avaliaram os efeitos da exposição do alumínio ( $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) em pH = 5,0 (24h e 96h) em piaussú, *Leporinus macrocephalus*, e observaram que os peixes expostos somente ao meio ácido não alteraram seus parâmetros hematológicos, iônicos e metabólicos e concluíram que esta espécie é altamente tolerante à exposição ao meio ácido. Por outro lado, a exposição (24 h) à associação de meio ácido e Al- aumentou o Htc e a glicose, mas não modificou a Hb e a proteína plasmática (PP).

Muitos fatores interferem nas respostas hematológicas, dentre eles a hipóxia (MARCON; WILHELM FILHO, 1999; AFFONSO et al., 2002). Val e Almeida-Val (1995) compilaram trabalhos de diferentes autores e verificaram que, de modo geral, em condições de hipóxia foi observado

aumento do hematócrito, da hemoglobina e do número de eritrócitos em diversas espécies de peixes amazônicos, tanto em condições ambientais como experimentais. Quando em condições de hipóxia, os peixes tendem a apresentar significativas mudanças adaptativas nas funções da hemoglobina (WELLS, et al., 1989). Krogh e Leitch (1919) sugeriram que os peixes se adaptam à hipóxia por meio de aumentos na capacidade de transporte de oxigênio da hemoglobina e que normalmente animais nativos de ambientes hipóxicos apresentam altas concentrações de hemoglobina. Wells et al. (1989) expuseram o peixe antártico “borchs”, *Pagothenia borchgrevinki*, à hipóxia ambiental e observaram aumento do Htc, da Hb e do lactato.

Os peixes compensam a baixa tomada de oxigênio, na prevalência da condição hipóxica, com aumento no número de eritrócitos (WEPENER et al., 1992). Este aumento é decorrente do estímulo adrenérgico nos tecidos hematopoiéticos, para contração esplênica e liberação dos eritrócitos armazenados para a circulação sanguínea (NILSSON; GROVE, 1974). Moura et al. (1997) observaram aumento de eritrócitos circulantes resultantes da contração esplênica em tambaqui exposto à hipóxia. Affonso et al. (2002) estudando esta mesma espécie observaram, em resposta à hipóxia (12 h), aumento na hemoglobina, eritrócitos e MCHC, sugerindo aumento na capacidade do sangue em carrear oxigênio. De acordo com Weber e Jensen (1988) e Jensen et al. (1993), o aumento do hematócrito via liberação de eritrócitos presentes no baço muitas vezes, é decorrente de exposição aguda à hipóxia e o estímulo à eritropoiese ocorre em exposições crônicas. Mas indiferentes ao período de exposição, os eritrócitos liberados podem ser imaturos apresentando baixa concentração de Hb.

Aumentos no VCM têm sido associados com fatores como a hipóxia e estresse (WEBER, 1982). A exposição à hipóxia aguda libera catecolaminas que interferem no equilíbrio osmótico das membranas eritrocitárias, causando inchaço nas células e aumento do VCM (BUTLER et al., 1978; PERRY et al., 1989; RANDALL; PERRY, 1992). As catecolaminas, por sua vez, elevam o volume dos eritrócitos assim

como o pH intracelular, aumentando a afinidade da hemoglobina com o oxigênio (SPRY; WOOD, 1984).

Panepucci et al. (2001) avaliaram os efeitos da exposição do pacu à hipóxia por seis horas e não encontraram diferenças no hematócrito, na hemoglobina, e nos eritrócitos. Poucos estudos avaliaram os efeitos do cobre em meio hipóxico, dificultando a comparação dos parâmetros hematológicos nesta associação.

## 2. Considerações

No cultivo de peixes existem vários fatores que alteram a qualidade da água, como a presença excessiva de fitoplâncton, plantas aquáticas e algas, as quais causam redução da concentração de OD, aumento de  $\text{CO}_2$  e consequentemente redução do pH. A grande quantidade de microalgas presente no meio consome oxigênio e libera dióxido de carbono, sendo que altas taxas de  $\text{CO}_2$  acidificam a água, diminuindo o pH. Neste caso, a taxa de respiração muitas vezes excede a fotossíntese.

O limite superior estabelecido para o cobre, oxigênio dissolvido e pH pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2006) é  $0.009 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre,  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  OD ( $\cong 105 \text{ mmHg}$ ) e pH entre 6,0 e 9,0 (resolução vigente nº 020/1986) em ecossistemas aquáticos destinados para aquicultura (classe 2). De acordo com o relatório recente, publicado pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, em muitos rios do estado de São Paulo, a concentração de cobre dissolvido excede o limite estabelecido, variando de  $0.01$  a  $0.02 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre. As variações de pH são menos corriqueiras mas as oscilações de OD são frequentes (CETESB, 2007).

O uso de produtos com cobre no ambiente aquático é uma questão relevante na química ambiental. Produtos como o  $\text{CuSO}_4$ , utilizados

em diferentes concentrações na agricultura e aquicultura, representam grande fonte de contaminação. Como descrito nesta revisão, as condições em que o  $\text{CuSO}_4$  é aplicado na aquicultura, geralmente, são caracterizadas por apresentarem baixa concentração de OD, pH ácido e excesso de  $\text{CO}_2$ . Entretanto, a avaliação da toxicidade do cobre muitas vezes ocorre em condições controladas, o que poderá mascarar seus efeitos quando comparados às condições em que ele é utilizado.

A capacidade dos organismos para a biotransformação de substâncias exógenas é importante fator na determinação de efeitos de poluentes ambientais. Neste contexto, o estudo dos efeitos da exposição ao cobre em condições de hipóxia e meio ácido sobre biomarcadores em peixes pode, além de elucidar mecanismos de toxicidade do metal, indicar possíveis efeitos sobre o bem estar animal, levando ao uso racional deste composto em aquicultura.



## Referências Bibliográficas

ADELMAN, I. R.; SMITH, L. L. Toxicity of hydrogen sulfide to goldfish (*Carassius auratus*) as influenced by temperature, oxygen, and bioassay techniques. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 29, n. 9, p. 1309-1317, 1972.

AFFONSO, E. G.; POLEZ, V. L. P.; CORRÊA, C. F.; MAZON, A. F.; ARAUJO, M. R. R.; MORAES, G.; RANTIN, F. T. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Toxicology & Pharmacology, New York, v. 133, n. 3, p. 375-382, 2002.

AHMAD, S. **Oxidative stress and antioxidant defenses in biology**. New York: Chapman & Hall, 1995. 61 p.

ALLEN, H. E.; HANSEN, D. J. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. **Water Environment Research**, Alexandria, v. 68, n. 1, p. 42-54, 1996.

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; HOCHACHKA, P. W. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: status of an under-explored "goldmine". In: HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P. L.; SICK, T.; ROSENTHAL, M.; VAN DEN THILLART, G. (Ed.). **Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation**. Boca Raton: CRC, 1993. p. 435-445.

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; WALKER, I. Long-term and short-term adaptation to varying oxygen levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. (Ed.). **Biology of tropical fishes**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1999. p. 185-206.

AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; BARKA, S.; PELLERIN, J.; RAINBOWD, P. S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 160-202, 2006.

ANDREW, R. W.; BIESINGER, K. E.; GLASS, G. E. Effects of inorganic complexation on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. **Water Research**, New York, v. 11, n. 3, p. 309-315, 1977.

ANDROS, J. D.; GARTON, R. R. Acute lethality of copper, cadmium, and zinc to northern squawfish. **Transactions of the American Fisheries Society**, Washington, v. 109, n. 2, p. 235-238, 1980.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: métodos e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006 p. 117-152.

ARAGÃO, M. A.; BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E. Total hardness of surface waters in São Paulo State (Brazil). **Acta Limnologica Brasileira**, Rio Claro, v. 15, n. 1, p. 15-18, 2003.

ASKNES, A.; NJAA, L. R. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part B. Biochemistry & Molecular Biology, New York, v. 69, n. 4, p. 893-896, 1981.

AVCI, A.; KAÇMAZ, M.; DURAK, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 60, n. 1, p. 101-105, 2005.

AY, O.; KALAY M.; TARNER, L.; CANLI, M. Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na, K-ATPase activity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, California, v. 62, n. 2, p. 160-168, 1999.

BAER, K. N.; THOMAS, P. Influence of capture stress, salinity and reproductive status on zinc associated with metallothioneinlike-proteins in the liver of three teleost species. **Marine Environmental Research**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 277-287, 1990.

BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 151-162, 1996.

BAKER, R. T. M.; HANDY, R. D.; DAVIES, S. J.; SNOOK, J. C. Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the gray mullet, *Chelon labrosus*. **Marine Environmental Research**, Amsterdam, v. 45, n. 4-5, p. 357-365, 1998.

BARCAROLLI, I. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Aluminium in acid water on hematological and physiological parameters of neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, California, v. 72, n. 3, p. 639-646, 2004.

BARRY, H. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

BEAUMONT, M. W.; BUTLER, P. J.; TAYLOR, E. W. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle and membrane potential. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 259-272, 2000.

BEAUMONT, M. W.; BUTLER, P. J.; TAYLOR, E. W. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to sub-lethal copper concentrations in soft, acid water and its effect upon sustained swimming performance. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 45-63, 1995a.

BEAUMONT, M. W.; BUTLER, P. J.; TAYLOR, E. W. Plasma ammonia concentration in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to sublethal copper in soft, acidic water and its relationship to decreased swimming performance. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 198, n. 10, p. 2213-2220, 1995b.

BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor on some biochemical aspects of

*Clarias batrachus* (Linnaeus). **Environmental Research**, San Diego, v. 80, n. 1, p. 80-83, 1999.

BERNER, R. A. A new geochemical classification of sedimentary environments. **Journal of Sedimentary Petrology**, Tulsa, v. 551, n. 2, p. 359-365, 1981.

BLUST, R.; FONTAINE, A.; DECLEIR, W. Effect of hydrogen ions and inorganic complexing on the uptake of copper by the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Marine Ecology**. Progress Series, Amelinghausen, v. 76, p. 273-282, 1991.

BOGDANOVA, A.; OGUNSHOLA, O. O.; BAUER, C.; NIKINMAA, M.; GASSMANN, M. Molecular mechanisms of oxygen-induced regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 536, p. 231-238, 2003a.

BOGDANOVA, A.; OGUNSHOLA, O. O.; BAUER, C.; GASSMANN, M. Pivotal role of reduced glutathione in oxygen-induced regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump in mouse erythrocyte membranes. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 195, n. 1, p. 33-42, 2003b.

BOGDANOVA, A.Y.; VIRKKI, L. V.; GUSEV, G. P.; NIKINMAA, M. Copper effects on ion transport across lamprey erythrocyte membrane: Cl<sup>-</sup>/OH<sup>-</sup> exchange induced by cuprous ions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 159, n. 3, p. 204-213, 1999.

BORGMANN, U. Metal speciation and toxicity of free metal ions to aquatic biota. In: NRIAGU, J. O. (Ed.). **Advances in environmental science and technology**. New York: Wiley, 1983 p. 47-72.

BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Birmingham: Bermington, 1990. 482 p.

BOYD, C. E. **Water quality for pound aquaculture**. Alburn: Alburn University, 1998. 37 p. (Research and development series, n. 43).

BOYD, C. E.; MASSAUT, L. Risk associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquatic Engineering**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 113-132, 1999.

BRAGIGAND, V.; BERTHET, B. Some methodological aspects of metallothionein evaluation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A. Molecular & Integrative Physiology, New York, v. 134, n. 1, p. 55-61, 2003.

BRAUM, E.; JUNK, W. J. Morphological adaptation of two Amazonian Characoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters. **Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie**, Berlin, v. 67, n. 6, p. 869-886, 1982.

BREMNER, I. Metallothionein and copper metabolism in liver. In: RIORDAN, J. F.; VALLEE, B. L. (Ed.). **Methods in enzymology**: metallobiochemistry, Part B: metallothionein and related molecules. San Diego: Academic Press, 1991. p. 584-591, 1991. (Methods in Enzymology, 205).

BRIX, K. V.; DEFOREST, D. K.; ADAMS, W. J. Assessing acute and chronic copper risk to freshwater aquatic life using species sensitivity distributions for different taxonomic groups. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, n. 8, p. 1846-1856, 2001.

BROUWER, M.; WINGE, D. R.; GRAY, W. R. Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American lobster *Homarus americanus*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 35, n. 4, p. 289-303, 1989.

BUCKLEY, J. A. Complexation of copper in the effluent of a sewage treatment plant and an estimate of its influence on toxicity to coho salmon. **Water Research**, New York, v. 17, n. 12, p. 1929-1934, 1983.

BUERTTNER, G. R. The packing order of free radical and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: métodos e aplicações**. São Carlos: Rima, 2008. p. 55-88.

BUTLER P. J.; TAYLOR E. W.; CAPRA M. F.; DAVIDSON W. The effect of hypoxia on the level of circulating catecholamines in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. **Journal of Comparative Physiology**. Part B. Metabolic and Transport Functions, Berlin, v. 127, n. 4, p. 325-330, 1978.

CAI, L.; SATOH, M.; TOHYAMA, C.; CHERIAN, M. G. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. **Toxicology**, Limerick, v. 132, n. 2-3, p. 85-98, 1999.

CAJARAVILLE; M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 247, n. 2-3, p. 295-311, 2000.

CAMPBELL, P. G. C. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: TESSIER, A.; TURNER, D. R. (Ed.). **Metal speciation and bioavailability in aquatic systems**. New York: J. Wiley, 1995. p. 45-102.

CAMPBELL, H. A.; HANDY, R. D.; NIMMO, M. Copper uptake kinetics across the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) measured using an improved isolated perfused head technique. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 46, n. 3-4, p. 177-190, 1999.

CAMPBELL, P. G. C.; STOKES, P. M. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. **Canadian Journal and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 42, n. 12, p. 2034-2049, 1985.

CARBONELL, G.; TARAZONA, J. V. A proposed method to diagnose acute copper poisoning in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 134, suppl. 2, p. 1329-1334, 1993.

CARBONELL, G.; TARAZONA, J. V. Toxicokinetics of copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 29, n. 3-4, p. 213-221, 1994.

CARVALHO, C. S. **Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre na sangue e fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881)**. 2003. 107 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

CARVALHO, C. S.; ARAÚJO, H. S. S.; FERNANDES, M. N. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part B. Biochemistry & Molecular Biology, New York, v. 137, n. 2, p. 225-234, 2004.

CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 251, n. 1, p. 109-117, 2006.

CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A. Molecular & Integrative Physiology, New York, v. 151, n. 3, p. 437-442, 2008.

CASSEE, F. R.; GROTEN, J. P.; VAN BLADEREN, P. J.; FERON, V. J. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. **Critical Reviews in Toxicology**, Florida, v. 28, n. 1, p. 73-101, 1998.

CASSILAS, E.; SMITH, L. S. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fish Biology**, London, v. 10, n. 5, p. 481-491, 1977.

CASSINI, A.; FAVERO, M.; ALBERGONI, V. Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and whiteblooded antarctic teleost fish, *Pagothenia bernacchii* and *Chionodraco hamatus*. **Comparative**

**Biochemistry and Physiology.** Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 106, n. 2, p. 333-336, 1993.

CAVALETTO, M.; GHEZZI, A.; BURLANDO, B.; EVANGELISTI, V.; CERRATTO, N.; VIARENGO, A. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. **Comparative Biochemistry and Physiology.** Part C. Toxicology & Pharmacology, New York, v. 131, n. 4, p. 447-455, 2002.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter response in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 83-91, 2002.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo**: 2006. São Paulo: 2007. 327 p.

CHAKOUMAKOS, C.; RUSSO, R.C.; Thurston, R. V. Toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH and hardness. **Environmental Science and Technology**, Washington, DC, v. 13, n. 2, p. 213-218, 1979.

CHANDEL, N. S.; SHUMACKER, P. T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 88, n. 5, p. 1880-1889, 2000.

CHOW, C. K. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 32, n. 5, p. 1066-1081, 1979.

CHRISTENSEN, G. M.; MCKIM, J. M.; BRUNGS, W. A.; HUNT, E. P. Changes in the blood of the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus* Lesueur) following short and long term exposure to copper (II). **Toxicology and Applied Pharmacology**, Orlando, v. 23, n. 3, p. 417-427, 1972.



CLAIBORNE, J. B.; CHOE, K. P.; MORRISON-SHETLAR, A. I.; WEAKLEY, J. C.; HAVIRD, J.; FREIJI, A.; EVANS, D. H.; EDWARDS, S. L. Molecular detection and immunological localization of gill Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in the dogfish (*Squalus acanthias*). **American Journal of Physiology**. Regulatory Integrative and Comparative Physiology, Bethesda, v. 294, n. 3, p. 1092-1102, 2008.

ÇOĞUM, Y. H.; KARGIN, F. Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 277-282, 2004.

COMELLAS, A. P.; DADA, L. A.; LECUONA, E.; PESCE, L. M.; CHANDEL, N. S.; QUESADA, N.; SCOTT BUDINGER, G. R.; STROUS, G. J.; CIECHANOVER, A.; SZNAJDER, J. I. Hypoxia-mediated degradation of Na,K-ATPase via mitochondrial reactive oxygen species and the ubiquitin-conjugating system. **Circulation Research**, v. 98, n. 10, p. 1314-1322, 2007.

CONNOLLY, N. M.; CROSSLAND, M. R.; PEARSON, R. G. Effect of low dissolved oxygen on survival, emergence, and drift of tropical stream macroinvertebrates. **Journal of the North American Benthological Society**, Glenview, v. 23, n. 2, p. 251-270, 2004.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resoluções vigentes publicadas entre julho de 1984 e maio de 2006**. Brasília, DF, 2006. 808 p.

COOPER, R. U.; CLOUGH, L. M.; FARWELL, M. A. WEST, T. L. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 279, n. 1-2, p. 1-20, 2002.

CORREIA, A. D.; LIVINGSTONE, D. R.; COSTA, M. H. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. **Marine Environmental Research**, Amsterdam, v. 54, n. 3-5, p. 357-360, 2002.

COUSINS, R. J. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 65, n. 2, p. 238-309, 1985.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; LAZZARI, R.; DUARTE, M. F.; MORSCH, V. M.; PIPPI, A. L.; VIEIRA, A. P. Effects of Clomazone Herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 65, n. 1, p. 48-55, 2006.

CUSIMANO, R. F.; BRAKKE, D. F.; CHAPMAN, G. A. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 43, n. 8, p. 1497-1503, 1986.

CYRIAC, P. J.; ANTONY, A.; NAMBIAN, N. K. Hemoglobin and hematocrit values in the fish *Oreochromis mossambicus* (Peters) after short term exposure to copper and mercury. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, California, v. 43, n. 2, p. 315-320, 1989.

DANG, Z. **Adaptive stress responses in fish gills**. 2000. 183 p. PhD Thesis - Catholic University of Nijmegen, Nijmegen, Netherlands.

DANG, Z.; LOCK, R. A. C.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S. E. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 277, n. 1, R320-R331, 1999.

DAUTREMEPUITS, C.; BETOULLE, S.; VERNET, G. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1573, n. 1, p. 4-8, 2002.

DAUTREMEPUITS, C.; PARIS-PALACIOS, S.; BETOULLE, S.; VERNET, G. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus*

*carpio*) induced by copper and chitosan. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Toxicology & Pharmacology, New York, v. 137, n. 4, p. 325-333, 2004.

DAVEY, E. W.; MORGAN, M. J.; ERICKSON, S. J. A biological measurement of copper complexation capacity of seawater. **Limnology Oceanography**, New York, v. 18, n. 6, p. 993-997, 1973.

DAVIES, K. J. A. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB Life**, London, v. 50, n. 4-5, p. 279-289, 2000.

DAY, N.; BUTLER, P. J. Environmental acidity and white muscle recruitment during swimming in the brown trout (*Salmo trutta*). **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 199, n. 9, p. 1947-1959, 1996.

DE BOECK, G.; MEEUS, W.; COEN, W. D.; BLUST, R. Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*), and gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 179-188, 2004.

DE BOECK, G.; VLAEMINCK, A.; BALM, P. H. M.; LOCK, R. A. C.; DE WACHTER, B.; BLUST, R. Morphological and metabolic changes in common carp, *Cyprinus carpio*, during short-term copper exposure: interaction between  $\text{Cu}^{2+}$  and plasma cortisol elevation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, n. 2, p. 374-381, 2000.

DE BOECK, G.; VAN DER VEN, K.; MEEUS, W.; BLUST, R. Sublethal copper exposure induces respiratory stress in common and gibel carp but not in rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Toxicology & Pharmacology, New York, v. 144, n. 4, p. 380-390, 2007.

DEGROOT, H.; LITTAUER, A. Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. **Free Radical Biology & Medicine**, Elmsford, v. 6, n. 5, p. 541-551, 1989.

DEPLEDGE, M. H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: FOSSI, M. C.; LEONZIO, C. (Ed.). **Nondestructive biomarkers in vertebrates**. Boca Raton: Lewis, 1993. p. 261-285.

DESROCHERS, P.; HOFFERT, J. R. Superoxide dismutase provides protection against the hyperoxia in the retina of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part B. Comparative Biochemistry, New York, v. 76, n. 2, p. 241-247, 1983.

DETHLOFF, G. M.; SCHLENK, D.; HAMM, J. T.; BAILEYÀ, H. C. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 42, n. 3, p. 253-264, 1999.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1997. 1007 p.

DI GIULIO, R. T.; WASHBURN, P. C.; WENNING, R. J.; WINSTON, G. W.; JEWELL, C. S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 8, n. 12, p. 1103-1123, 1989.

DODGE, E. E.; THEIS, T. L. Effect of chemical speciation on the uptake of copper by *Chironomus tentans*. **Environmental Science and Technology**, Washington, DC, v. 13, n. 10, p. 1287-1288, 1979.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of the cell function. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUNCAN, W. L. P. **Estresse metabólico e dano celular em *Colossoma macropomum* e *Hoplosternum littorale* exposto ao petróleo.** 1998. 117 f. Dissertação (Mestrado) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus.

DUNN, J. F.; HOCHACHKA, P. W. Metabolic responses of trout (*Salmo gairdneri*) to acute environmental hypoxia. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 123, n. 1, p. 229-242, 1986.

DUQUESNE, S. J. **Bioaccumulation metallique et metallothioneins chez trois espèces de poissons provenant du littoral Nord-Pas de Calais.** 1992. 307 p. Thèse - Université des Sciences et des Technologies de Lille, Lille.

EDDY, F. B. Uptake and loss of potassium by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in fresh water and dilute sea water. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 118, n. 1, p. 277-286, 1985.

EFFLER, S. W.; LITTEN, S.; FIELD, S. D.; TONG-NGORK, T.; HALE, F. Whole lake response to low level copper sulfate treatment. **Water Research**, New York, v. 14, n. 10, p. 1489-1499, 1980.

ENGLISH, T. E.; STOREY, K. B. Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 206, n. 14, p. 2517-2524, 2003.

ERICKSON, R. J.; BENOIT, D. A.; MATTSON, V. R. **A prototype toxicity factors model for site-specific copper water quality criteria.** Duluth: United States Environmental Protection Agency, Environmental Research, 1987.

ERICKSON, R. J.; BENOIT, D. A.; MATTSON, V. R.; NELSON JUNIOR, H. P.; LEONARD, E. N. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 15, n. 2, p. 181-193, 1996.

ERICKSON, S. F.; MALONEY, T. E.; GENTILE, J. H. Effect of nitrilotriacetic acid on the growth and metabolism of estuarine phytoplankton. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, Alexandria, v. 42, n. 8, p. 329-335, 1970.

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Aquatic life ambient freshwater quality criteria**: copper 2007 revision. Springfield, 2007. 48 p. EPA-822-R-07-001.

FABISIAK, J. P.; TYRIUN, V. A.; TYURINA, Y. Y.; BORISENKO, G. G.; KOROTAEVA, A.; PITT, B. R.; LAZO, J. S.; KAGAN, V. E. Redox regulation of copper-metallothionein. Arch. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 363, n. 1, p. 171-181, 1999.

FERREIRA, A. B. G.; AMADEU, S. L.; SOARES, V. M. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 28-39, 2008.

FITZGERALD, J. P. Comparative analysis of superoxide dismutase activities in a range of temperate and tropical teleost fish. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. **Comparative Biochemistry**, v. 101, n. 1-2, p. 111-114, 1992.

FLIK, G.; KLAREN, P. H. M.; SCHOENMAKERS, T. J. M.; BIJVELDS, M. J. C.; VERBOST, P. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Cellular calcium transport in fish: unique and universal mechanisms. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 69, n. 2, p. 403-417, 1996.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung and lung mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 256, n. 21, p. 10986-10992, 1981.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease: free radicals tissue injury. **Laboratory Investigation**, Hagerstown, v. 47, n. 5, p. 412-426, 1982.

FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution. In: QUALIANELLO, E.; PALMIERI, F.; SINGER, T. P. (Ed.). **Horizons in biochemistry and biophysics**. Reading: Addison-Wesley, 1975. p. 1-37.

GATLIN, D. M.; WILSON, R. P. Dietary copper requirements of fingerling channel catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 54, n. 4, p. 277-285, 1986.

GEORGE, S. G.; OLSSON, P. E. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: KRAMER, K. J. M. (Ed.). **Biomonitoring of coastal waters and estuaries**. Boca Raton: CRC, 1994. p. 151-178.

GRANDE, M. Effect of copper and zinc on salmonid fishes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCES IN WATER POLLUTION RESEARCH, 3., 1967, Munich. **Proceedings...** Washington, D.C: Water Pollution Control Federation, 1967. p. 97-111.

GRIFFIN, B. R.; HOBBS, M. S.; GOLLON, J. L. Effect of waterborne copper sulfate exposure on copper content in liver and axial muscle of channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 9, n. 2, p. 144-150, 1999.

GRISHAM, M. B. **Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine**. Austin: CRC, 1992. p. 4-22.

GROSELL, M.; BLANCHARD, J.; BRIX, K. V.; GERDES, R. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 84, n. 2, p. 162-172, 2007.

GROSELL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Toxicology and Pharmacology, New York, v. 133, n. 1-2, p. 287-303, 2002.

GUY, R. D.; KEAN, A. R. Algae as a chemical speciation monitor I. A comparison of algal growth and computer calculated speciation. **Water Research**, New York, v. 14, n. 7, p. 891-899, 1980.

GWOZDINSKI, K. A spin label study of the action of cupric and mercuric ions on human red blood cells. **Toxicology**, Limerick, v. 65, n. 3, p. 315-323, 1991.

HAI, D. Q.; VARGAS, S. I.; MATKOVICS, B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 117, n. 1, p. 83-88, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon, 1985. 346 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2nd ed. Oxford: Clarendon, 1989. 543 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemistry Journal**, Ottawa, v. 219, n. 1, p. 1-14, 1984.

HAMER, D. H. Metallothionein. **Annual Reviews of Biochemistry**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 913-951, 1986.

HAN, F. X.; HARGREAVES, J. A.; KINGERY, W. L.; HUGGETT, D. B.; SCHLENK, D. K. Accumulation, distribution and toxicity of copper in sediments of catfish ponds receiving periodic copper sulfate applications. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 30, n. 3, p. 912-919, 2001.

HANAZATO, T.; DODSON, S. I. Synergistic effects of low-oxygen concentration, predator kairomone, and a pesticide on the cladoceran *Daphnia-Pulex*. **Limnology and Oceanography**, Baltimore, v. 40, n. 4, p. 700-709, 1995.



HARTWELL, S. I.; JIN, J. H.; CHERRY, D. S.; CAIRNS, J. Toxicity versus avoidance response of golden shiner, *Notemigonus crysoleucas*, to five metals. **Journal of Fish Biology**, London, v. 35, n. 3, p. 447-456, 1989.

HAUX, C.; SJOBECK, M.; LARSSON, A. Some toxic effects of lead on fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. New York: Academic Press, 1981. p. 340-341.

HEATH, A. G. Effect of water-borne copper on physiological responses of bluegill (*Lepomis macrochirus*) to acute hypoxic stress and subsequent recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Comparative Pharmacology, New York, v. 100, n. 3, p. 559-564, 1991.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton: CRC, 1995. 384 p.

HECHT, T.; ENDEMANN, F. The impact of parasites, infections and diseases on the development of aquaculture in sub-Saharan Africa. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 14, n 3-4, p. 213-221, 1998.

HEISLER, N. Interaction between gas exchange, metabolism, and ion transport in animals: an overview. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 67, n. 12, p. 2923-2935, 1989.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: STOREY, K. B.; STOREY, J. M. (Ed.). **Cell and molecular responses to stress**. Amsterdam: Elsevier, 2001. v. 2, p. 263-287.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Oxidative inactivation of GST from a freezing tolerant reptile. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 124, n. 2, p. 149-158, 1993.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Role of antioxidants defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 189, n. 1-2, p. 79-89, 1998.

HOCHACHKA, P. W. Glucose and acetate metabolism of fish. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 56, n. 1, p. 717-729, 1961.

HOCHACHKA, P. W. **Living without oxygen**. Cambridge: Harvard University, 1980. p. 100-116.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation**. Princeton: Princeton University, 1973. 538 p.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation**. Princeton: Princeton University, 1984. p. 85-144.

HOWARTH. R. S.; SPRAGUE, J. B. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. **Water Research**, New York, v. 12, n. 7, p. 455-462, 1978.

HUNT, D. T. E. **Trace metal speciation and toxicity to aquatic organisms**: a review. Marlow: Water Research Centre, 1987. (Technical Report, 247).

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. **Macroinvertebrate biomarkers**: links to toxicosis and changes in population or communities. cooperative centre for freshwater ecology. Canberra: University of Canberra: Cooperative Research Centre for Freshwater Ecology, 2000. (Technical Report ScD5).

INGLIS, A.; DAVIS, E. L. **Effects of water hardness on the toxicity of several organic and inorganic herbicides to fish**. Washington, DC: United States Fish and Wildlife Service, 1972. 22 p. (Technical Paper, 67).

ISANI, G.; CATTANI, O.; CARPENE, E.; CORTESI, P. Kinetic properties of liver and muscle pyruvate kinase of a marine teleost, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part B. Comparative Biochemistry, New York, v. 107, n. 4, p. 616-624, 1994.

JACKSON, T. A. Effects of inorganic cadmium, zinc, copper, and mercury on methylmercury production in polluted lake sediments: evidence for selective inhibition and stimulation of microbial species based on variations in heavy metal tolerance. In: NRIAGU, J. O. (Ed.). **Environmental impacts of smelters**. New York: John Wiley, 1984. p. 551-578.

JENSEN, F. B.; NIKINMAA, M.; WEBER, R. E. Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. (Ed.). **Fish ecophysiology**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 161-179.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. London: Edmundsbury Press, 1994. 300 p.

KÄGI, J. H. R. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In: SUZUKI, K. T.; IMURA, N.; KIMURA, M. (Ed.). **Metallothioneins III: biological roles and medical implications**. Basel: Birkhauser Verlag, 1993. p. 29-55.

KÄGI, J. H. R.; NORDBERG, M. **Metallothionein**. Basel: Birkhauser Verlag, 1979. 152 p.

KIL, I. S.; SHIN, S. W.; YEO, H. S.; LEE, Y. S.; PARK, J. Mitochondrial NADP<sup>+</sup> dependent isocitrate dehydrogenase protects cadmium-induced apoptosis. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 70, n. 3, p. 1053-1061, 2006.

KOLOK, A. S.; HARTMAN, M. M.; SERSHAN, J. The physiology of copper tolerance in fathead minnows: insight from an intraspecific, correlative analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 21, n. 8, p. 1730-1735, 2002.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radicals inhibit catalase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 257, n. 10, p. 5751-5754, 1982.

KRAMER, J. H.; MISIK, V.; WEGLIICKI, W. B. Lipid peroxidation derived free radical production and post-ischemic myocardial reperfusion injury. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 723, p. 180-196, 1994.

KROGH, A.; LETHCH, I. The respiratory function of blood in fishes. **Journal of Physiology**, Bethesda, v. 52, n. 5, p. 288-300, 1919.

KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes**. Campo Grande: [s.n.], 1998. 60 p.

LARSSON, A.; HAUX, C.; SJÖBECK, M. Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 9, n. 3, p. 250-281, 1985.

LAURÉN, D. J.; MCDONALD, D. G. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Comparative Physiology**. Part B. Biochemical, Systematic, and Environmental Physiology, Berlin, v. 155, n. 5, p. 635-644, 1985.

LAURÉN, D. J.; MCDONALD, D. G. Influence of water hardness, pH and alkalinity on the mechanisms of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 43, n. 8, p. 1488-1496, 1986.

LEENA, S.; OOMMEN, O. V. Hormonal control of enzymes of osmoregulation in a teleost, *Anabas testudineus* (BLOCH): an *in vivo* and *in vitro* study. **Endocrine Research**, New York, v. 26, n. 2, p. 169-187, 2000.

LEMAIRE, P.; FORLIN, L.; LIVINGSTONE, D. R. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A-inducers

(3-methylcholanthrene, b-naphtho.avone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 36, n. 3-4, p. 141-160, 1996.

LEUNG, K. M. Y.; FURNESS, R. W. Metallothionein induction and condition index of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) exposed to cadmium and hydrogen peroxide. **Chemosphere**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 321-325, 2001.

LEUNG, K. M. Y.; SVAVARSSON, J.; CRANE, M.; MORRITT, D. Influence of static and fluctuating salinity on cadmium uptake and metallothionein expression by the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 274, n. 2, p. 175-189, 2002.

LI, J.; QUABIUS, E. S.; WENDELAAR BONGA, S. E.; FLIK, G.; LOCK, R. A. C. Effects of water-bone copper on branchial chloride cells and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 1-11, 1998.

LICHTENFELS A. J.; LORENZI-FILHO, G.; GUIMARÃES, E. T.; MACCHIONE, M.; SALDIVA, P. H. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 115, n. 1, p. 47-60, 1996.

LIN, H.; RANDALL, D. J. The effect of varying water pH on the acidification of expired water in rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 149, n. 1, p. 149-160, 1990.

LINDE, A. R.; SÁNCHEZ-GALÁN, S.; VALLEZ-MOTA, P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Metallothionein as bioindicator of fresh water metal pollution: european eel and brown trout. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 49, n. 1, p. 60-63, 2001.

LINDER, M. C. Copper and genomic stability in mammals. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 475, n. 1-2, p. 141-152, 2001.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 195-211, 1993.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A. Molecular & Integrative Physiology, New York, v. 120, n. 1, p. 43-49, 1998.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 42, n. 8, p. 656-666, 2001.

LLOYD, R. Effect of dissolved oxygen concentration on several poisons to Rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 38, n. 2, p. 447-455, 1961.

LOPES, P. A.; PINHEIRO, T.; SANTOS, M. C.; MATHIAS, M.; COLARES-PEREIRA, M. J.; VIEGAS-CRESPO, A. M. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 280, n. 1-3, p. 153-163, 2001.

LORZ, H. W.; MCPHERSON, B. P. Effects of copper or zinc in fresh water on adaptation to sea water and ATPase activity and the effects of copper on migratory disposition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 33, n. 9, p. 2023-2030, 1976.

LUSHCHAK, V. I.; LUSHCHAK, L. P.; MOTA, A. A.; HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **American Journal of Physiology**. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, Bethesda, v. 280, n. 1, p. R100-R107, 2001.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 42 n. 4, p. 630-648, 1985.

MARCON, J. L.; WILHEM FILHO, D. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminae) from the Amazon. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, Oxford, v. 123, n. 3, p. 257-263, 1999.

MARGOSHES, M.; VALLEE, B. L. A cadmium protein from equine kidney cortex. **Journal of American Chemical Society**, Easton, v. 79, n. 17, p. 4813-4814, 1957.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 15, n. 1-2, p. 75-88, 2005.

MASON, A. Z.; JENKINS, K. D. Metal detoxification in aquatic organisms. In: TESSIER, A.; TURNER, D. R. (Ed.). **Metal speciation and bioavailability in aquatic systems**. London: John Wiley, 1995. p. 479-608.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Limerick, v. 153, n. 1-3, p. 83-104, 2000.

MATHIESSEN, P. **Biological effects quality assurance in monitoring programs (BELQUALM)**. Essex: Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, 2000. 24 p.

MAZEAUD, F.; MARAL, J.; MICHELSON, A. M. Distribution of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the carp: erythrocytic manganese SOD. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 86, n. 4, p. 1161-1168, 1979.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research**, San Diego, v. 88, n. 1, p. 52-63, 2002a.

MAZON, A. F.; FERNANDES, M. N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, California, v. 63, n. 6, p. 797-804, 2001.

MAZON, A. F.; MONTEIRO, E. A. S.; PINHEIRO, G. H. D.; FERNANDES, M. N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 62, n. 4A p. 621-631, 2002b.

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. Biological markers of environmental contamination. In: MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. (Ed.). **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton: Lewis, 1990. p. 3-14.

MCCORMICK, S. D. Hormonal control of gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase and chloride cell function. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; FARRELL, A. P. (Ed.). **Fish physiology**: v. 14: cellular and molecular approaches to fish ionic regulation. New York: Academic Press, 1995. p. 285-316.

MCDERMOTT, B. M.; FLATT, P. R.; STRAIN, J. J. Effects of copper deficiency and experimental diabetes on tissue antioxidant enzyme levels in rat. **Annals of Nutrition and Metabolism**, Basel, v. 38, n. 5, p. 263-269, 1994.

MCDONALD, D. G.; READER, J. P.; DALZIEL, T. R. K. The combined effects of pH and trace metals on fish ionoregulation. In: MORRIS, R.; TAYLOS, E. W.; BROWN, D. J. A.; BROWN, J. A. (Ed.). **Acid toxicity and aquatic animals**. Cambridge: Cambridge Univertisty, 1989. p. 221-242.



MCGEER, J. C.; PLAYLE, R. C.; WOOD, C. M.; GALVEZ, F. A. physiologically based biotic ligand model for predicting the acute toxicity of waterborne silver to rainbow trout in freshwaters. **Environmental Science and Technology**, Washington, DC, v. 34, n. 19, p. 4199-4207, 2000.

MCKIM, J. M. Physiological and biochemical mechanisms that regulate the accumulation and toxicity of environmental chemicals in fish. In: HAMELINK, J. L.; LANDRUM, P. F.; BERGMAN, H. L.; BENSON, W. H. (Ed.). **Bioavailability**: physical, chemical, and biological interactions. Boca Raton: Lewis, 1994. p. 179-202.

MCKIM, J. M.; CHRISTENSEN, G. M.; HUNT, E. P. Changes in the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after short-term and long-term exposure to copper. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 27, n. 10, p. 1883-1889, 1970.

MENEZES, A. C. L. **Toxicidade do cobre sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8**. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

MILLER, T. G.; MACKAY, W. C. The effects of hardness, alkalinity and pH of test water on the toxicity of copper to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Water Research**, New York, v. 14, n. 2, p. 129-133, 1980.

MILLIGAN, C. L.; WOOD, C. M. Disturbances in haematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo Gairdneri*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 99, n. 1, p. 397-415, 1982.

MONTEIRO, S. M.; MANCERA, J. M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; SOUSA, M. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Toxicology & Pharmacology, New York, v. 141, n. 4, p. 375-383, 2005.

MORAES, G.; AVILEZ, I. M.; ALTRAN, A. E.; BARBOSA, C. C. Biochemical and hematological responses of the banked knife fish *Gymnotus carapo* (LINNEAUS, 1758) to environmental hypoxia. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 64, n. 4A, p. 633-640, 2002.

MORAES, G.; CHIPPARI, A. R.; GUERRA, C. D. R.; GOMES, L. C.; SOUZA, R. H. S. Immediate changes on metabolic parameters of the freshwater teleost fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu) under severe hypoxia. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 10, p. 45-52, 1997b.

MORAES, G.; CHOUDHURI, J. V.; SOUZA, R. H. S. Metabolic strategies of *Hypostomus regani* (cascudo), a fresh-water teleost fish under extreme environmental hypoxia. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 10, p. 35-44, 1997a.

MORAES, G.; OLIVEIRA, M. A.; RANTIN, F. T. The metabolic pattern changes of *Hoplias malabaricus* from normóxia to hypoxic conditions. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 2, p. 191-196, 1996.

MORRIS, S. M.; ALBRIGHT, J. T. Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in the rete mirabile and gas gland epithelium of six species of marine fishes. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 232, n. 1, p. 29-39, 1984.

MOSLEH, Y. Y.; PARIS-PALACIOS, S.; ARNOULT, F.; COUDERCHET, M.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Metallothionein induction in aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to herbicide isoproturon. **Environmental Toxicology**, New York, v. 19, n. 1, p. 88-93, 2004.

MOUNEYRAC, C.; AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C. Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghausen, v. 162, p. 125-135, 1998.

MOURA, M. A. F.; OLIVEIRA, M. I. S.; VAL, A. L. Effects of hypoxia on leucocytes of two Amazon fish *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale*. **Revista da Universidade do Amazonas**. Série Ciências Biológicas, Manaus, v. 1, n. 2, p. 13-22, 1997.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: métodos e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. p. 15-38.

MUTO, N.; REN, H. W.; HWANG, G. S.; TOMINAGA, S.; ITOH, N.; TANAKA, K. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by airpumping stress, dexamethasone, and metals. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 122, n. 1, p. 75-82, 1999.

NAKAMURA, M.; YAMAZAKI, I. One-electron transfer reactions in biochemical systems. VI. Changes in electron transfer mechanism of lipoamide dehydrogenase by modification of sulfhydryl groups. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 267, n. 2, p. 249-257, 1972.

NEWMAN, S. G. Bacterial vaccines for fish. **Annual Review of Fish Diseases**, Danvers, v. 3, p. 145-185, 1993.

NILSSON, S.; GROVE, D. J. Adrenergic and cholinergic innervation of the spleen of the cod: *Gadus morhua*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 135-139, 1974.

NOVELLI FILHO, J. L. V. B.; NOVELLI, E. L. B.; MANZANO, M. A.; LOPES, A. M.; CATANEO, A. C.; RIBAS, B. O. Effect of tocopherol on superoxide radical and toxicity of cadmium exposure. **International Journal of Environmental Health Research**, Abingdon, v. 10, n. 2, p. 125-134, 2000.

NRIAGU, J. O. A silent epidemic of environmental metal poisoning.

**Environmental Pollution**, Barking, v. 50, n. 1-2, p. 139-161, 1988.

NUSSEY, G. **The effect of copper on the blood coagulation and general haematology of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae)**. 1994. 545 f. M.Sc.-Thesis - Rand Afrikaans University, South Africa.

NUSSEY, G.; VAN VUREN, J. H. J.; DU PREEZ, H. H. Effect of copper on the hematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 111, n. 3, p. 369-380, 1995.

O'CONNOR, D. V.; FROMM, P. O. The effect of methyl mercury on gill metabolism and blood parameters of rainbow trout. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, California, v. 13, n. 4, p. 406-411, 1975.

OLIVEIRA, C. P. F. **Efeito do cobre e do chumbo presentes na água de formação derivada da extração de petróleo da província petroleira do Urucu - AM, sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1918)**. 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

OLSVIK, P. A.; GUNDERSEN, P.; ANDERSEN, R. A.; ZACHARIASEN, K. E. Metal accumulation and metallothionein in two populations of trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments a run-off episode. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 50, n. 4, p. 301-316, 2000.

OTTO, D. M. E.; MOON, T. W. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 349-358, 1996.

PAGENKOPF, G. K. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. **Environmental Science and Technology**, Washington, DC, v. 17, n. 6, p. 342-347, 1983.

PANEPUCCI, R. A.; PANEPUCCI, L.; FERNANDES, M. N.; SANCHES, J. R.; RANTIN, F. T. The effects of hypoxia and recuperation on carbohydrate metabolism in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 61, n. 4, p. 547-554, 2001.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; FOULEY, A.; VERNET, G. Metallothioneins in liver of *Rutilus rutilus* exposed to  $\text{Cu}^{2+}$ . Analysis by metal summation, SH determination and spectrofluorimetry. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 126, n. 2, p. 113-122, 2000.

PAUL, R. J.; COLMORGEN, M.; PIROW, R.; CHEN, Y.-H.; TSAI, M.-C. Systemic and metabolic responses in *Daphnia magna* to anoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A. Molecular and Integrative Physiology, v. 120, n. 3, p. 519-530, 1998.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnósticos e tratamentos**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1998. 264 p.

PAVICIC, J.; SKREBLIN, M.; KREBAR, I.; TUSEK-ZIDARIC, M.; STEGNAR, P. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations. I. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 107, n. 2, p. 249-257, 1994.

PEDRAJAS, J. R.; PEINADO, J.; LOPEZ-BAREA, J. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn superoxide dismutase as potential biomarkers. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 98, n. 3, p. 267-282, 1995.

PELGROM, S. M. G. J.; LOCK, R. A. C.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 32, n. 4, p. 303-320, 1995.

PENA, M. M. O.; LEE, J.; THIELE, D. J. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 7, p. 1251-1260, 1999.

PERRY, S. F.; KINKEAD, R.; GALLAUGHER, P.; RANDALL, D. J. Evidence that hypoxemia promotes catecholamines release during hypercapnic acidosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Respiration Physiology**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 651-364, 1989.

PISTOLE, D. H.; PELES, J. D.; TAYLOR, K. Influence of metal concentrations, percent salinity, and length of exposure on the metabolic rate of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Toxicology & Pharmacology, New York, v. 148, n. 1, p. 48-52, 2008.

PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 60, n. 7, p. 1010-1016, 1982.

PLAYLE, R. C.; GENSEMER, R. W.; DIXON, D. G. Copper accumulation on gills of fathead minnows: influence of water hardness, complexation and pH of the gill micro environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 11, n. 3, p. 381-389, 1992.

PRASAD, A. S. Trace metals in growth and sexual maturation. In: RENNER, O.; CHAN, W.-I. (Ed.). **Metabolism of trace metals in man**. Boca Raton: CRC, 1984. v. 1, p. 79-94.

PRATAP, H. B.; WENDELAAR BONGA, S. E. Effect of water-borne cadmium on plasma cortisol and glucose in the cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Comparative Pharmacology, New York, v. 95, n. 2, p. 313-317, 1990.

RÁBAGO-CASTRO, J. L.; SANCHEZ J. G.; PÉREZ-CASTAÑEDA. A.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ R. Effects of the prophylactic use of Romet®-30

and copper sulfate on growth, condition and feeding indices in Channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 253, n. 1-4, p. 343-349, 2006.

RADIE, A. A. R.; HAY, D. Q.; GABRIELAK, T.; MATOKOVICS, B. Comparative antioxidative enzyme study in freshwater fishes I. Distribution of superoxide dismutase, peroxide decomposing enzymes and lipid peroxidation in herbivorous fishes. **Acta Biologica Hungarica**, Budapeste, v. 36, p. 169-174, 1985b.

RADIE, A. A. R.; HAY, D. Q.; MATOKOVICS, B.; GABRIELAK, T. Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behaviour. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Comparative Pharmacology and Toxicology, New York, v. 81, n. 2, p. 395-399, 1985a.

RAJBANSHI, V. K.; GUPTA, A. K. Alterations in the architecture of gill surface produced by water-borne copper in Hepteroneusters fossilis (Bloch). **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, Weinheim, v. 16, p. 325-332, 1988.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology**. London: Taylor & Francis, 1995. 1156 p.

RANDALL, D. J.; PERRY, S. F. Catecholamines. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; FARREL, A. P. (Ed.). **Fish physiology**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 255-300.

RANTIN, F. T.; GUERRA, C. D. R.; KALININ, A. L.; GLASS, M. L. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A. Molecular & Integrative Physiology, New York, v. 119, n. 4, p. 991-997, 1998.

RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Aquatic surface respiration (ASR) and cardiorespiratory responses of *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei,

serrasalmidae), during graded and acute hypoxia. In: VAL, A. L.; RANDALL, D. J.; MACKINLEY, D. (Ed.). **The physiology of tropical fish symposium**. San Francisco: San Francisco State University, 1996. 141 p.

RATTER, B. A.; HEATH, A. G. Environmental factors affecting contaminat toxicity in aquatic and terrestrial vertebrates. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JUNIOR, G. A.; CAIRNS JUNIOR, J. (Ed.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis, 1995. 755 p.

REARDON, I. S.; HARRELL, R. M. Acute toxicity of formalin and copper sulfate to striped bass fingerlings held in varying salinities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 87, n. 3, p. 255-270, 1990.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 81-114, 1992.

ROESIJADI, G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 113, n. 2, p. 117-123, 1996.

ROESIJADI, G.; DRUM, A. S.; THOMAS, J. M.; FELLINGHAM, G. W. Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low weight, mercury-binding proteins. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 13, n. 7, p. 250-253, 1982.

ROESIJADI, G.; FELLINGHAM, G. W. Influence of Cu, Cd and Zn pre-exposure on Hg toxicity in the mussel *Mytilus edulis*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 44, n. 3, p. 680-684, 1987.

ROESIJADI, G.; KLERKS, P. L. Kinetic analysis of cadmium binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *Journal of Experimental Zoology*, New York, v. 251, n. 1, p. 1-12, 1989.



ROMÉO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J. P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 48, n. 2-3, p. 185-194, 2000.

ROMÉO, M.; GNASSIA-BARELLI, M. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 118, n. 1, p. 33-37, 1997.

RONCERO, V.; DURÁN, E.; SOLER, F.; MASOT, J.; GÓMEZ, L. Morphometric, structural and ultrastructural studies of tench (*Tinca tinca* L.) hepatocytes after copper sulfate administration. **Environmental Research**, San Diego, v. 57, n. 1, p. 45-58, 1992.

ROWLEY, D. A.; HALLIWELL, B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 225, n. 1, p. 279-284, 1983.

ROY, J. **Environmental contaminants encyclopedia**: copper entry. Fort Collins: National Park Service, Water Resources Divisions, 1997. p. 99.

RUUGE, E. K.; LENDENEV, A. N.; LAKOMKIN, A. A.; KSENZENKO, M. Y. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 261, n. 4, p. 81-86, 1991. Supplement.

SAINT-PAUL, U. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae). **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 11, n. 1, p. 53-62, 1984.

SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; MEUNIER, L.; COQUERY, M.; PORCHER, J. M.; AIT-AISSA, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback, relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 177-183, 2005.

SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. **Food Chemistry**, London, v. 68, n. 2, p. 175-178, 2000.

SANTOS, L. R. B. dos. **Efeitos da dieta suplementada com vitamina E e cobre nas respostas metabólicas e antioxidantes de matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunter, 1869), frente à hipóxia**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SATO, M.; BREMNER, I. Oxygen free radicals and metallothionein. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 14, n. 3, p. 325-337, 1993.

SATOH, M.; TSUJI, Y.; WATANABE, Y.; OKONOGI, H.; SUZUKI, Y.; NAKAGAWA, M.; SHIMIZU, H. Metallothionein content increased in the liver of mice exposed to magnetic fields. **Archives of Toxicology**, New York, v. 70, n. 5, p. 315-318, 1996.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHLENK, D.; KENNETH, B. D.; GRIFFIN, B. R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, n. 1-4, p. 367-397, 1999.

SCHUBAUER-BERIGAN, M. K.; DIERKES, J. R.; MONSON, P. D.; ANKLEY, G. T. pH dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn, to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyaella azteca* and *Lumbriculus variegates*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 12, n. 7, p. 1261-1266, 1993.

SCHWARZENBACH, R. P.; ESCHER, B. I.; FENNER, K.; HOFSTETTER, T. B.; JOHNSON, C. A.; VON GUNTEN, U.; WEHRLI, B. The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, Washington, DC, v. 313, n. 5790, p. 1072-1077, 2006.

SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Adaptive changes of liver composition and structure in golden ide during winter acclimatization. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 255, n. 2, p. 171-85, 1990.

SERAFIM, A.; COMPANY, R. M.; BEBIANNO, M. J.; LANGSTON, W. J. Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. **Marine Environmental Research**, Amsterdam, v. 54, n. 3-5, p. 361-365, 2002.

SHAH, S. L.; HAFEEZ, M. A.; SHAIKH, S. A. Changes in haematological parameters and plasma glucose in the fish, *Cyprinion watsoni*, in response to zinc and copper treatment. **Pakistan Journal of Zoology**, Lahore, v. 27, n. 3, p. 249-253, 1995.

SHAW, T. L.; BROWN, V. M. The toxicity of some forms of copper to rainbow trout. **Water Research**, New York, v. 8, n. 6, p. 377-382, 1974.

SHOUBRIDGE, E. A.; HOCHACHKA, P. W. The origin and significance of metabolic carbon dioxide production in the anoxic goldfish. **Molecular Physiology**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 315-338, 1981.

SIDELL, B. D. Cardiac metabolism in the *Myxinidae*: physiological and phylogenetic considerations. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A. Comparative Physiology, Oxford, v. 76, n. 3, p. 495-505, 1983.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.

SINGH, H. S.; REDDY, T. V. Effect of copper sulfate on hematology, blood chemistry, and hepato-somatic index of an Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), and its recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 20, n. 1, p. 30-35, 1990.

SINGH, M. Haematological responses in a freshwater teleost *Channa punctatus* to experimental copper and chromium poisoning. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 16, n. 4, p. 339-341, 1995.

SOENGAS, J.; MOON, T. Uptake and metabolism of glucose, alanine and lactate by red blood cells of the American eel *Anguilla rostrata*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 198, n. 4, p. 877-888, 1995.

SOIVIO, A.; NIKINMAA, M. The swelling of erythrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. New York: Academic Press, 1981. p. 103-119.

SOIVIO, A.; WESTMAN, K.; NYHOLM, K. Changes in haematocrit values in blood samples treated with and without oxygen: a comparative study with four Salmonid species. **Journal of Fish Biology**, London, v. 6, n. 6, p. 163-69, 1974.

SPRAGUE, J. B. Avoidance reactions of rainbow trout to zinc sulphate solutions. **Water Research**, New York, v. 2, n. 5, p. 367-372, 1968.

SPRY, D. I.; WOOD, C. M. Acid base, plasma ion and blood gas changes in rainbow trout during short term toxic zinc exposure. **Journal of Comparative Physiology**. Part B. Metabolic and Transport Functions, Berlin, v. 154, n. 2, p. 149-158, 1984.

STARODUB, M. E.; WONG, P. T. S.; MAYFIELD, C. I.; CHAU, Y. K. Influence of complexation and pH on individual and combined heavy metal toxicity to a freshwater alga. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 44, n. 6, p. 1173-1180, 1987.

STIFF, M. J. Copper/bicarbonate equilibria in solutions of bicarbonate ion at concentrations similar to those found in natural water. **Water Research**, New York, v. 5, n. 5, p. 171-197, 1971.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 12, p. 1715-1733, 1996.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. **Quarterly Review of Biology**, New York, v. 65, n. 2, p. 145-174, 1990.

STOUTHART, A. H.; HAANS, J. L. M.; LOCK, R. A. C.; WENDELAAR BONGA, S. E. Effects of water pH on copper toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 15, n. 3, p. 376-383, 1996.

STRAUS, D. L.; TUCKER, C. S. Acute toxicity of copper sulfate and chelated copper to channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 24, n. 3, p. 390-395, 1993.

STRIVASTAVA, P. N.; NARAIN, A. S. Catfish blood chemistry under environmental stress. **Experientia**, Basel, v. 41, n. 7, p. 855-857, 1985.

STUHLBACHER, A.; BRADLEY, M. C.; NAYLOR, C.; CALOW, P. Induction of cadmium tolerance in two clones of *Daphnia magna* Straus. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Comparative Pharmacology and Toxicology, New York, v. 101, n. 3, p. 571-577, 1992.

SUNDA, W. G.; LEWIS, J. A. M. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. **Limnology and Oceanography**, Baltimore, v. 23, n. 5, p. 870-876, 1978.

TAKASUSUKI, J.; ARAUJO, M. R. R.; FERNANDES, M. N. Effect of Water pH on Copper Toxicity in the Neotropical Fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodondidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, California, v. 72, n. 5, p. 1075-1082, 2004.

TAO S.; LONG, A.; LIU, C.; DAWSON, R. The influence of mucus on copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 47, n. 1, p. 59-64, 2000.

TAO, S.; LIANGT, T.; CAO, J.; DAWSON, R.; LIU, C. F. Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 44, n. 2, p. 190-195, 1999.

TAO, S.; LONG, A.; XU, F.; DAWSON, W. Copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*) at various levels of pH. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 52, n. 3, p. 221-226, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; SCHALCH, S. H. C.; ONAKA, E. M.; QUINTANA, C. I. F.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>). **Acta Scientiarum. Animal Science**, v. 24, n. 2, p. 547-554, 2002.

TAYLOR, E. W.; BEAUMONT, M. W.; BUTLER, P. J.; MUJALLID, M. S. I. Lethal and sub-lethal effects copper upon fish: a role for ammonia toxicity. In: TAYLOR, E. W. (Ed.). **Toxicology of aquatic pollution: physiological, cellular and molecular approaches**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 85-113.

THEVENOD, F.; FRIEDMANN, J. M. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of N<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, n. 13, p. 1751-1761, 1999.

THORBURN, M. A.; MOCCIA, R. D. Use of chemotherapeutics on trout farms in Ontario. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 5, n. 2, p. 85-91, 1993.

THORNTON, J. A.; RAST, W. The use of copper and copper compounds as algicides. In: RICHARDON, W. T. (Ed.). **The handbook of copper compounds and applications**. Boca Raton: CRC, 1997. p. 123-142.

TOMASSO, J. R.; SIMCO, B. A.; DAVIS, K. B. Circulating corticosteroid and leucocyte dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) during net confinement. **Texas Journal of Science**, Austin, v. 35, n. 1, p. 83-88, 1983.

TONGUTHAI, K. Control of freshwater fish parasites: a Southeast Asian perspective. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1185-1191, 1997.

TORT, L.; TORRES, P.; FLOS, R. Effects on dogfish haematology and liver composition after acute copper exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Comparative Pharmacology and Toxicology, New York, v. 87, n. 2, p. 349-353, 1987.

UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME. **Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme**. Athens, 1999. 39 p.

VAL, A. L. **Hemoglobinas de Colossoma macropomun Cuvier, 1918 (Charcoidei, Pisces): aspectos adaptativos (Ilha da Marchantaria, Manaus, AM)**. 1986. 224 f. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus.

VAL, A. L. Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of the Amazon. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; RANDALL, D. J. (Ed.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 59-73.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Fishes of the Amazon and their environments: physiological and biochemical features**. Heidelberg: Springer Verlag, 1995. 224 p.

VAN DEN THILLART, G.; VAN WAARDE, A. Teleosts in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism. **Molecular Physiology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 393-409, 1985.

VAN DER MERWE M. **Aspects of heavy metal concentration in the Olifants River, Kruger National Park, and the effect of copper on the haematology of *Clarias gariepinus* (Clariidae).** 1992. 167 f. M.Sc. Thesis - Rand Afrikaans University, South Africa.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAN VUREN, J. H. The effects of toxicants on the haematology of *Labeo umbratus* (Teleostei: Cyprinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Comparative Pharmacology**, New York, v. 83, n. 1, p. 155-159, 1986.

VAN WEERD, J. H.; KOMEN, J. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 120, n. 1, p. 107-112, 1998.

VARANASI, U.; MARKEY, D. Uptake and release of lead and cadmium in skin and mucus of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Comparative Pharmacology**, New York, v. 60, n. 2, p. 187-191, 1978.

VARANKA, Z.; ROJIK, I.; VARANKA, I.; NEMCSOK, J.; ABRAHAM, M. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio L.*) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 128, n.3, p. 467-478, 2001.

VIARENGO, A. Heavy metal in marine invertebrate: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences**, Boca Raton, v. 1, p. 295-317, 1989.



VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CAVALETTO, M.; MARCHI, B.; PONZANO, E.; BLASCO, J. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 46, n. 6, R1612-R1619, 1999.

VIARENGO, A.; NOTT, J. A. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Comparative Pharmacology and Toxicology, New York, v. 104, n. 3, p. 355-372, 1993.

VIARENGO, A.; PERTICA, M.; MANCINELLI, G.; PALMERO, S.; ZANICCHI, G.; BOUQUEGNEAU, J. M.; ORUNESU, M. Biochemical characterization of copper-thioneins isolated from the tissues of mussels exposed to the metal. **Molecular Physiology**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 41-52, 1984.

VIARENGO, A.; PERTICA, M.; MANCINELLI, G.; ZANICCHI, G.; ORUNESU, M. Rapid induction of copper-binding proteins in the gills of metal exposed mussels. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Comparative Pharmacology, New York, v. 67, n. 2, p. 215-218, 1980.

VÍG, E.; NEMCSÓK, J. The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp *Cyprinus carpio*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 35, n. 1, p. 23-25, 1989.

VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 116, p. 89-95, 1997.

VIRANI, N. A.; REES, B. B. Oxygen consumption, blood lactate and interindividual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Molecular & Integrative Physiology, New York, v. 126, n. 3, p. 397-405, 2000.

WALSH, P. J.; HENRY, R. P. Carbon dioxide and ammonia metabolism and exchange. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.).

**Biochemistry and molecular biology of fishes.** Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 1, p. 181-207.

WANG, T.; KNUDSEN, P. K.; BRAUNER, C. J.; BUSK, M.; VIJAYAN, M. M.; JENSEN, F. B. Copper exposure impairs intra- and extracellular acid-base regulation during hypercapnia in the fresh water rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Comparative Physiology.** Part B. Biochemical, Systematic, and Environmental Physiology, Berlin, v. 168, n. 8, p. 591-599, 1998.

WDZIECZAK, J.; ZALESNA, G.; WUJEC, E.; PÉRES, G. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology.** Part B. Comparative Biochemistry, New York, v. 73, n. 2, p. 361-365, 1982.

WEBER, R. E. Interspecific adaptation of haemoglobin function in fish to oxygen availability. In: ADDINK, A. D. F.; SPRONK, N. (Ed.). **Exogenous and endogenous influences on metabolic and neural control.** Oxford: Pergamon, 1982. p. 87-101.

WEBER, R. E.; JENSEN, F. B. Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. **Annual Review of Physiology,** Palo Alto, v. 50, p. 161-179, 1988.

WEBER, J. M.; ZWINGESLSTEIN, G. Circulatory substrate fluxes and their regulation. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of fishes.** Amsterdam: Elsevier, 1995. v. 4, p. 15-32.

WEDEMEYER, G. A.; MCLEAY, D. J. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish.** New York: Academic Press, 1981. p. 247-275.

WEDEMEYER, G. A.; YASUTAKE, W. T. **Clinical methods for assessment of the effects of environmental stress on fish health**. Washington, DC: U.S. Fish and Wildlife Service, 1977. 18 p. (Technical papers of the U.S. Fish and Wildlife Service, 89).

WELLS, B. R. M.; BEARD, G. C. G. L. A.; SUMMERS, G. Hypoxic responses in fish from a stable environment: blood oxygen transport in the antarctic fish *Pagothenia borchgrevink*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 97-11, 1989.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WENDELAAR BONGA, S. E.; FLIK G.; BALM, P. H.; VAN DER MEIJ, J. C. The ultrastructure of chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 259, n. 3, p. 575-585, 1990.

WEPENER, V.; VAN VUREN, J. H.; DU PREEZ, H. H. The effect of hexavalent chromium at different pH values on the hematology of *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Comparative Pharmacology and Toxicology, New York, v. 101, n. 2, p. 375-381, 1992.

WILHELM FILHO, D.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in marine fish: II. Elasmobranchs. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 106, n. 2, p. 415-418, 1993.

WILHELM FILHO, D.; GIUVILI, C.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in marine fish. I. Teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, Oxford, v. 106, n. 2, p. 409-413, 1993.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; ZANIBONI-FILHO, E.; PEDROSA, R. C. Effect of different oxygen tension on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 244, n. 1-4, p. 349-357, 2005.

WILLIAMS, R. J. P. Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. Series B. Biological Sciences, London, v. 294, n. 1071, p. 57-74, 1981.

WILSON, R.; TAYLOR, E. W. The physiological responses of freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acutely lethal copper exposure. **Journal of Comparative Physiology**. Part B. Biochemical, Systematic, and Environmental Physiology, Berlin, v. 163, n. 1, p. 38-47, 1993.

WINKALER, E. B.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.

WINZER, K.; WINSTON, G. W.; BECKER, W. VAN.; NOORDEN, C. J. F.; HOCHLER, A. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Patichthys flesus* L.). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 143-155, 2001.

WOOD, C. M. The physiological problems of fish in acid waters. In: MORRIS, R.; TAYLOR, E. W.; BROWN, D. J. A.; BROWN, J. A. (Ed.). **Acid toxicity and aquatic animals**. Cambridge: Cambridge University, 1989. p. 125-152.

WOOD, C. M. Acid-base and ion balance, metabolism, and their interactions, after exhaustive exercise in fish. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 160, n. 1, p. 285-308, 1991.

WOOD, C. M. Toxic responses of the gill. In: BENSON, W. H.; SCHLEUH, D. W. (Ed.). **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**. Washington, DC: Taylor & Francis, 2001. p. 1-87.

WOOTTONM, R. J. **Ecology of teleost fishes**. New York: Chapman and Hall, 1990. 404 p.

WU, S. M.; SHIH, M.; HO, Y. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C. Toxicology & Pharmacology, New York, v. 145, n. 2, p. 218-226, 2006.

WURTS, W. A.; DURBOROW, R. M. **Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds**. Stoneville: SRAC, 1992. 4 p. Aquaculture program. (SRAC publication, n. 464).

YESAKI, T. Y.; IWAMA, G. K. Some effects of water hardness on survival, acid-base regulation, ion regulation and ammonia excretion in rainbow trout in highly alkaline water. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 65, n. 4, p. 763-787, 1992.

YIM, M.; CHOCK, P.; STADTMAN, E. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, n. 6, p. 4099-4105, 1993.

ZAGATTO, P. A. **Évaluation écotoxicologique du réservoir Guarapiranga, Brésil, em relation avec le problème des algues toxiques e algicides**. 2005. 86 f. Thèse de doctorat – Université de Metz, Metz.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: métodos e aplicações**. São Carlos: Rima, 2008. p. 413-432.

ZIKIC, R. V.; STAJN, A.; SAICIC, Z. S.; SPASIC, M. B.; ZIEMNICKI, K.; PETROVIC, V. M. The activities of superoxide dismutase, catalase and ascorbic acid content in the liver of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. **Physiological Research**, Viena, v. 45, n. 6, p. 479-481, 1996.

ZITKO, V.; CARSON, W. G. A mechanism of the effects of water hardness on the lethality of heavy metals to fish. **Chemosphere**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 299-303, 1976.



---

*Meio Ambiente*

Ministério da  
**Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

